



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAMILA CRISTINA PASQUALI

**ANÁLISES EVOLUTIVA, ESTRUTURAL E MECANÍSTICA DA
ARQUITETURA MULTIDOMÍNIO DAS GLUTAMINASES HUMANAS E
ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE GLUTAMINASES E O RECEPTOR
ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA**

Campinas

2017

CAMILA CRISTINA PASQUALI

**ANÁLISES EVOLUTIVA, ESTRUTURAL E MECANÍSTICA DA
ARQUITETURA MULTIDOMÍNIO DAS GLUTAMINASES HUMANAS E
ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE GLUTAMINASES E O RECEPTOR
ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do Título
de Doutora em Ciências, na área de concentração
em Fármacos, Medicamentos e Insumos para
Saúde.

Orientador: Dr. Andre Luís Berteli Ambrosio

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA CAMILA CRISTINA PASQUALI E
ORIENTADA PELO DR. ANDRE LUÍS BERTELI
AMBROSIO.

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/19518-2; FAPESP, 2013/01540-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

P264a Pasquali, Camila Cristina, 1989-
Análises evolutiva, estrutural e mecanística da arquitetura multidomínio das glutaminases humanas e estudo da interação entre glutaminases e o receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama / Camila Cristina Pasquali. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Andre Luís Berteli Ambrosio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glutaminase. I. Ambrosio, Andre Luís Berteli. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evolutionary, structural and mechanistical analyses of the multidomain architecture of the human glutaminases and study of the interaction between glutaminases and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutora em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Andre Luís Berteli Ambrosio [Orientador]

Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro

Alessandro Silva Nascimento

Juliana Helena Costa Smetana

Artur Torres Cordeiro

Data de defesa: 14-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 14 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Andre Luís Berteli Ambrosio

Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Dr. Artur Torres Cordeiro

Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro

Dr. Alessandro Silva Nascimento

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais João e Marcia,
minhas fontes absolutas de amor eterno e
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Andre, primeiramente, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Agradeço, também, por confiar no meu trabalho, me ensinar, me motivar, e por sempre desempenhar seu excelente papel como orientador.

À Sandra, pelos ensinamentos, cooperação e compartilhamento de ideias em diversos aspectos do meu trabalho.

À Alessandra Girasole, por todo suporte técnico.

À Juliana Oliveira, pelos ensinamentos, paciência e colaboração, em especial, nas etapas iniciais do meu projeto.

Ao Matheus Pinheiro, pelo enorme apoio prático e teórico nos momentos finais do meu doutorado.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Grupo PMT, pela amizade, pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório e pela colaboração experimental.

Em especial, à Larissa, Carolzinha, Luciana, Krishina, Grazi e Douglas, não somente pela amizade, como também por cada ajuda, assistência e cooperação – tanto experimental quanto emocional – prestadas durante o meu doutorado.

À Angela Fala, Carol Cassago e Igor Monteze, pela amizade e cooperação.

Aos meus pais, por todos os esforços (e sacrifícios) dedicados para garantir minha formação pessoal e profissional.

Aos colaboradores científicos Dr. Ricardo Diogo Righeto, Dr. Jefferson Bettini, Dr. Rodrigo Villares Portugal, Dr. Wyatt W. Yue, Dr. Ana Gonzalez, Dr. Rodrigo V. Honorato e Dr. Paulo Sergio O. Lopes.

Aos membros da banca de qualificação do projeto, Dr. Daniel Maragno Trindade e Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias.

Aos membros da banca de análise prévia desta tese, Dr. Juliana Helena Costa Smetana, Dr. Artur Torres Cordeiro e Dr. Marcos Vicente Albuquerque Salles Navarro.

Aos membros da comissão examinadora desta tese durante a sua sessão pública de defesa: Dra. Juliana Helena Costa Smetana, Dr. Artur Torres Cordeiro, Dr. Marcos Vicente Albuquerque Salles Navarro

Aos laboratórios Robolab, LPP e LEC (LNBio/CNPEM), assim como a todos os seus funcionários e ex-funcionários que me auxiliaram nos experimentos.

Ao Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), Diamond Light Source (DLS), a todos os funcionários das linhas de luz utilizadas, ao Dr. Artur Cordeiro e Américo Ranzani, pela ajuda na coleta de dados.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologias de Produtos Bioativos (BTPB).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processos nº 2013/01540-9 e 2014/19518-2).

RESUMO

Com base na detecção de atividade e inibição enzimática tecido-específica por produtos de catálise, Hans Krebs demonstrou pioneiramente a existência de múltiplas glutaminases em mamíferos. Atualmente, são conhecidos dois genes humanos que codificam para pelo menos quatro isoformas de glutaminases. Neste trabalho, nós investigamos a origem e evolução de glutaminases. Com base na construção filogenética, propusemos que a arquitetura multidomínios de glutaminases é uma característica herdada de ancestrais bacterianos. Também propusemos um modelo evolutivo no qual o surgimento da isoforma mais ativa, glutaminase C (GAC), foi um evento tardio de retrotransposição, ocorrido em Chondrichthyes. As repetições de anquirina (ANK) foram adquiridas no início do processo evolutivo. Para obter informações a respeito do enovelamento do domínio ANK, resolvemos a estrutura cristalográfica da porção C-terminal de *kidney-type* glutaminase (KGA). Além disso, resolvemos a estrutura cristalina de KGA completa, contendo os três domínios N-terminal, catalítico e C-terminal. Estas estruturas explicam a capacidade reduzida desta isoforma em formar filamentos supra-tetraméricos cataliticamente ativos previamente observados em GAC. Considerando a presença de motivos de interação proteína-proteína, como ANK e *Nuclear Receptor* (NR) boxes, investigamos a interação de KGA com outras proteínas. O Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomo gama (PPAR γ) já havia sido identificado em nosso grupo como parceiro de KGA por duplo-híbrido em levedura. Neste trabalho, determinamos que o domínio de ligação aos ligantes de PPAR γ e os domínios N-terminal e catalítico de KGA são suficientes para a interação. KGA apresentou afinidade relativamente baixa com o receptor, com constantes de dissociação aparentes da ordem de micromolar, indicativo de interação fraca e transiente. A superexpressão de KGA resultou em aumento na atividade transcricional de PPAR γ , tanto em célula não tumoral (HEK-293T) quanto tumoral (MDA-MB-436). Coletivamente, estes resultados contribuem para o entendimento das diferenças entre as múltiplas glutaminases de mamíferos, podendo auxiliar no desenho de inibidores isoforma-específicos para o tratamento do câncer e de outras doenças.

ABSTRACT

On the basis of the detection of tissue-specific enzyme activity and inhibition by catalytic products, Hans Krebs first demonstrated the existence of multiple glutaminases in mammals. Currently, 2 human genes are known to encode at least 4 glutaminase isoforms. In this work, we investigated the origin and evolution of the glutaminases. We built a phylogenetic tree, and propose that the multidomain architecture of glutaminases is a feature inherited from bacterial ancestors. We also propose an evolutionary model wherein the appearance of the most active enzyme isoform, glutaminase C (GAC), which is expressed in many cancers, was a late retro transposon event that occurred in fishes from the Chondrichthyes class. The ankyrin (ANK) repeats in the glutaminases were acquired early in the evolutionary process. To obtain information on ANK folding, we solved the high-resolution structure of the ANK repeat- containing C-termini of kidney-type glutaminase (KGA). We also solved the novel crystal structure of multidomain KGA, containing N-terminal, glutaminase and C-terminal domains. The structures explain these proteins' compromised ability to assemble into catalytically active supra-tetrameric filaments, as previously shown for GAC. Considering the presence of protein-protein interaction domains, such as ANK and Nuclear Receptor (NR) boxes, we investigated the interaction of KGA with other proteins. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) was previously identified in our group as interaction partner of KGA using yeast two-hybrid approach. In this work, we determined that the Ligand Binding Domain (LBD) PPAR γ and both N-terminal and glutaminase domains of KGA are sufficient for mediating the interaction. KGA showed a relatively low affinity with the receptor. The apparent dissociation constants experimentally calculated fall into micromolar range and are indicative of a weak and transient interaction. Moreover, non tumoral (HEK-293T) and tumoral (MDA-MB-436) cells overexpressing KGA showed an increase of the transcriptional activity of PPAR γ . Collectively, these results provide information about glutaminases that will aid in the design of isoform-oriented glutaminase inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Transcritos de mRNA dos genes humanos de glutaminases.....	19
Figura 2. A estrutura do domínio glutaminase apresenta dois subdomínios e o sítio ativo está localizado na interface de ambos.....	20
Figura 3. Representação dos multidomínios das glutaminases KGA, GAC, GAB e LGA, codificadas pelos genes <i>GLS</i> (2q32.2) e <i>GLS2</i> (12q13.3).....	20
Figura 4. Representação do motivo ANK <i>repeat</i> canônico, contendo 33 resíduos de aminoácidos.....	24
Figura 5. Estrutura cristalina da proteína p18-INK4c (PDB 1IHB) contendo 5 ANK <i>repeats</i>	25
Figura 6. Principais destinos metabólicos e biossintéticos de Gln.....	27
Figura 7. Esquema dos isotipos humanos de PPAR β/δ , PPAR α e PPAR $\gamma_{1/2}$	30
Figura 8. Representação esquemática da orga-nização estrutural e funcional dos receptores nucleares.....	31
Figura 9. As mudanças na conformação da hélice 12 regulada por ligantes determina a atividade transcricional de receptores nucleares.....	32
Figura 10. Identificação dos domínios de KGA e PPAR γ envolvidos na interação entre as duas proteínas por duplo-híbrido em levedura	33
Figura 11. Identificação dos motivos do tipo NR box envolvidos na interação de KGA com o receptor PPAR γ utilizando o teste da β -galactosidase em papel filtro.....	34
Figura 12. As seis construções de KGA humana geradas por subclonagens e mutagêneses sítio-dirigidas para inserção de <i>stop codons</i> nas posições 221 e 551	40
Figura 13. Esquema do ensaio cinético para medir atividade de glutaminase	43
Figura 14. Diagrama esquemático do ensaio de anisotropia de fluorescência, envolvendo glutaminases (KGA e GAC) marcadas com o fluoróforo FITC para caracterização de sua interação com PPAR γ	50
Figura 15. Reação de bioluminescência catalisada pela luciferase de vagalume	52
Figura 16. Teste de expressão das subconstruções de KGA humana. Bactérias <i>E. coli</i> , cepa Rosetta II, foram transformadas com os plasmídeos resultantes das clonagens em pET-28a	55
Figura 17. Purificação de KGA 124-669 expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	56
Figura 18. Purificação de KGA 124-550 (Δ C) expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	56
Figura 19. Purificação de KGA 551-669 expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	57
Figura 20. Purificação de mGAC (Δ 1-127) expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	58
Figura 21. Purificação de PPAR γ DBD-LBD expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	59
Figura 22. Purificação de PPAR γ HLBD expressa de forma recombinante em <i>E. coli</i>	59
Figura 23. Resultado obtido no primeiro <i>screen</i> de cristalização de KGA C-terminal	60
Figura 24. Teste para identificação da protease ideal, dentre tripsina, quimotripsina e subtilisina, para a proteólise limitada de KGA C-terminal.....	62

Figura 25. Comparação entre a construção de KGA C-terminal e o fragmento resultante de sua proteólise limitada	63
Figura 26. <i>Screen</i> inicial de cristalização de KGA C-terminal resultante de proteólise limitada	64
Figura 27. Cristais de KGA C-terminal resultantes dos refinamentos de cristalização a partir das condições descritas na tabela 6	65
Figura 28. Características estruturais gerais dos domínios ANK de glutaminases...	67
Figura 29. Resultados do <i>screen</i> inicial de cristalização de KGA humana (124-669)	70
Figura 30. Etapas do refinamento de condições de cristalização para KGA 124-669	70
Figura 31. Estrutura de KGA completa e caracterização biofísica de KGA, GAC e ΔC	72
Figura 32. As glutaminases KGA e GAC em comparação com a construção envolvendo apenas a região comum entre elas, ΔC	74
Figura 33. Análises das sequências e arquiteturas de glutaminases eucarióticas e bacterianas	75
Figura 34. Reconstrução da história evolutiva da estrutura éxon-íntron dos genes <i>GLS</i> e <i>GLS2</i>	80
Figura 35. Resultados do ensaio de anisotropia de fluorescência a partir da titulação de construções de glutaminases (KGA 124-669 e ΔC) marcadas com FITC por PPAR γ DBD-LBD	82
Figura 36. Resultados dos ensaios de anisotropia de fluorescência a partir da titulação por PPAR γ <i>hinge</i> -LBD de KGA e GAC marcadas com FITC	83
Figura 37. Curvas de Michaelis-Menten obtidas para KGA na ausência e na presença de PPAR γ <i>hinge</i> -LBD em excesso molar de 10 e 50x em relação à enzima	84
Figura 38. Ensaio de gene repórter de luciferase para avaliar o efeito de KGA na atividade transcricional de PPAR γ	85
Figura 39. Ensaio de gene repórter de luciferase para avaliar o efeito de KGA na atividade transcricional de PPAR γ nas linhagens HEK-293T (A) e MDA-MD-436 (B)	86
Figura 40. Estruturas de proteínas que apresentam associação entre repetições ANK, resultando na formação de estados homo-oligoméricos	90
Figura 41. Exemplos de complexos envolvendo proteínas ANK que fazem interações com outras proteínas através da superfície convexa, oposta ao ANK <i>groove</i>	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Domínios de repetição em tandem e suas características.....	26
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na clonagem das subconstruções de KGA humana em pET-28a e mutagênese sítio-dirigida para inserção de <i>stop codon</i>	37
Tabela 3. Quantidade total de cada plasmídeo transfectados (em ng) em HEK-293T para cada replicata de cada uma das condições testadas no primeiro ensaio de gene repórter de luciferase.	52
Tabela 4. Quantidade total de cada plasmídeo transfectado (em ng) em HEK-293T para cada condição testada no segundo ensaio de gene repórter de luciferase.....	53
Tabela 5. Quantidade total de cada plasmídeo transfectados (em ng) em MDA-MB-436 para cada condição testada no segundo ensaio de gene repórter de luciferase.	54
Tabela 6. Condições de cristalização do screen inicial de KGA C-terminal resultante de proteólise limitada.	64
Tabela 7. Estatísticas da coleta de dados, processamento, faseamento e refinamento dos modelos para os conjuntos de S-SAD e nativo de KGA C-terminal..	66
Tabela 8. Interfaces homodiméricas termodinamicamente estáveis, previstas por PISA, para cada uma das estruturas ANK de glutaminases.	69
Tabela 9. Estatísticas de coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura de KGA. Os valores entre parênteses se referem à última faixa de resolução.	72
Tabela 10. Parâmetros cinéticos obtidos por ensaio de atividade das diferentes construções de glutaminases.	74
Tabela 11. Valores de K_{cat} , K_M e V_{max} aparentes obtidos nos ensaios de cinética de KGA (10 nM) isolada ou na presença de PPAR γ <i>hinge</i> -LBD em diferentes concentrações, após incubação por uma hora a 4°C.....	84
Tabela 12. Valores de K_{cat} , K_M e V_{max} aparentes obtidos nos ensaios de cinética de KGA (10 nM) isolada ou na presença de PPAR γ <i>hinge</i> -LBD e RGZ (500 μ M) em diferentes concentrações, após incubação por uma hora a 4°C.....	85
Tabela 13. Levantamento de estruturas cristalográficas representativas contendo Repetições ANK e que estão depositadas no PDB.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -KG: α -cetoglutarato

ϵ : Coeficiente de Extinção Molar

μ L: Microlitros

μ M: Micromolar

μ m: Micrômetros

ANK: *ankyrin*

ATP: Adenosina Trifosfato

BPTES: *Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide*

cm: Centímetros

C-terminal: carboxi-terminal

CV: Volume de coluna

Da: Daltons

DBD: DNA *binding domain*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FITC: Isotiacianato de Fluoresceína

GAB: Glutaminase B

GAC: Glutaminase C de *Mus musculus*

GDH: Glutamato Desidrogenase

Gln: Glutamina

GLS e GLS2: Nomenclatura dos genes que codificam para as glutaminases em humanos

GLS: Nomenclatura referente as isoformas proteicas codificadas pelo gene *GLS*

GLS2: Nomenclatura referente as isoformas proteicas codificadas pelo gene *GLS2*

Glu: glutamato

IMAC: *Immobilized metal ion affinity chromatography*

IPTG: *Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside*

K_{cat} : Constante Catalítica

kDa: Quilodaltons

K_M : Constante de Michaelis-Menten

L: Litros

LB: meio de cultura *Lysogeny Broth*

LBD: *ligand binding domain*

LGA: *Liver-type* Glutaminase

M: molar

mg: Miligramas

ms: Milisegundos

NAD⁺: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina oxidado

NADH: Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina reduzido

ng: Nanogramas

nM: Nanomolar

nm: Nanômetros

N-terminal: amino-terminal

NR: *nuclear receptor*

PDB: *Protein Data Bank*

PDZ: PSD95/DIgA/ZO-1

P_i: fosfato inorgânico

pmol: picomol

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

RGZ: Rosiglitazona

s: Segundos

SAD: *single-wavelength anomalous dispersion*

SDS-PAGE: Dodecil-sulfato de Sódio de poliacrilamida

TA: Temperatura ambiente

TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico

v/v: volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. As múltiplas glutaminases humanas: aspectos funcionais e mecanísticos.	17
1.2. Repetições de anquirina.....	24
1.3. Glutaminases e desenvolvimento do câncer.....	26
1.4. O receptor nuclear PPAR γ como um possível parceiro de interação das glutaminases GLS.....	29
1.5. Interação entre KGA e PPAR γ : <i>Background experimental</i>	33
2. Justificativa	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivos gerais.	36
3.2. Objetivos específicos.	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Materiais.....	37
4.1.1. Oligonucleotídeos.	37
4.1.2. Plasmídeos e vetores.....	37
4.1.3. Meios de cultura.	38
4.1.4. Linhagens celulares.	38
4.1.5. Tampões e soluções.	38
4.1.6. Colunas e resinas para purificação de proteínas.	39
4.1.7. Kits.....	39
4.2. Metodologia	40
4.2.1. Clonagem de KGA humana.....	40
4.2.2. Testes de expressão.	41
4.2.3. Expressão em larga escala.....	41
4.2.4. Purificação de proteínas recombinantes.....	42
4.2.5. Ensaio de atividade de glutaminase.	43
4.2.6. Proteólise limitada.....	45
4.2.7. Ensaio de cristalização.	45
4.2.8. Coleta de dados de difração de raios X.....	46
4.2.9. Processamento dos dados de difração de raios X.	47
4.2.10. Análises filogenéticas.....	47
4.2.11. Ensaio de Anisotropia de fluorescência.	48
4.2.12. Ensaio de gene repórter de luciferase.....	51

5. RESULTADOS	55
5.1. Testes de expressão das construções de KGA.	55
5.2. Expressão em larga escala e purificação de proteínas recombinantes.	55
5.2.1. Construções de glutaminases.	55
5.2.1.1. KGA 124-669.	55
5.2.1.2. KGA 124-550.	56
5.2.1.3. KGA 551-669.	57
5.2.1.4. mGAC (Δ 1-127).	57
5.2.2. Construções de PPAR γ .	58
5.2.2.1. DBD-LBD.	58
5.2.2.2. HLBD.	59
5.3. Estudos estruturais de KGA.	60
5.3.1. Determinação da estrutura cristalográfica da região C-terminal de KGA.	60
5.3.2. Determinação da estrutura completa de KGA humana.	69
5.4. Ensaios de atividade das construções de KGA.	73
5.5. Estudos evolutivos de KGA.	74
5.6. Caracterização da interação entre glutaminases e PPAR γ .	81
5.6.1. Ensaios de anisotropia de fluorescência.	81
5.6.2. Ensaio de atividade de KGA na presença de PPAR γ .	84
5.6.3. Ensaios de luciferase	85
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÃO	98
8. REFERÊNCIAS	100
9. ANEXOS	110
9.1. Artigo publicado na revista Journal of Biological Chemistry (JBC).	110
9.2. Termo de Autorização do Comitê de Biossegurança.	126
9.3. Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.	129

1. INTRODUÇÃO

1.1. As múltiplas glutaminases humanas: aspectos funcionais e mecanísticos.

Glutaminases são enzimas que catalisam a hidrólise do aminoácido glutamina (Gln), produzindo glutamato (Glu), concomitante com a geração de um íon amônio. De maneira geral, a existência de múltiplas isoenzimas em mamíferos foi primeiramente demonstrada por Hans Krebs, baseado na detecção de parâmetros cinéticos tecido-específicos e suscetibilidade a inibição pelo produto de catálise, enquanto testava a conversão de glutamina em glutamato em extratos teciduais de ratos (Krebs 1935). Até o momento, quatro isoformas de glutaminases já foram descritas em humanos, as quais são codificadas por dois genes distintos (Figura 1). As isoformas conhecidas coletivamente como GLS, a *Kidney-type* glutaminase (KGA) e a Glutaminase C (GAC), são geradas por *splicing* alternativo do gene *GLS* (2q32.2). Em contraste, as isoformas GLS2, *Liver-type* glutaminase (LGA) e Glutaminase B (GAB), originam do gene *GLS2* (12q13.3) através do uso alternativo de pontos de iniciação de transcrição e promotores (Martín-Rufián et al. 2012).

Em células normais, a expressão de KGA é ubíqua, sendo encontrada em todos os tecidos com atividade de glutaminase com exceção do fígado (Curthoys & Watford 1995; Aledo et al. 2000), apesar de ter sido reportada também em células endoteliais hepáticas (Lohmann, Souba, & Bode 1999). A variante GAC é predominantemente expressa em músculo cardíaco humano e pâncreas, ocorrendo também na placenta, rim e pulmão, porém, ausente no cérebro e fígado (Elgadi et al. 1999). Por sua vez, os transcritos derivados do gene *GLS2* foram identificados também em tecidos extra hepáticos, como cérebro, pâncreas e células de câncer de mama (Gómez-Fabre et al. 2000), contrariando as descobertas anteriores de que sua expressão estaria restrita ao fígado adulto (Smith & Watford 1990; Curthoys & Watford 1995).

Os dois genes parálogos que codificam para as glutaminases humanas supostamente se originaram a partir de um gene ancestral comum por duplicação seguida de evolução divergente (Porter et al. 2002; Pérez-Gómez et al. 2003). O gene *GLS* humano tem 82 kb (quilobases) e se divide em 19 éxons (Porter et al. 2002)

(Figura 1). O transcrito de KGA é composto por 18 éxons e formado pela junção dos éxons 1-14 e 16-19; o transcrito de GAC compreende apenas os 15 primeiros éxons (Elgadi et al. 1999; Porter et al. 2002). O gene *GLS2* humano tem comprimento de aproximadamente 18 kb e se divide em 18 éxons (Pérez-Gómez et al. 2003) (Figura 1). O transcrito canônico de GAB é formado pela junção de todos os 18 éxons do gene, enquanto que o éxon 1 está ausente no transcrito de LGA (Smith & Watford 1990; Martín-Rufián et al. 2012).

Embora localizados em cromossomos diferentes, os genes *GLS* e *GLS2* humanos apresentam grau considerável de similaridade sequencial. Desconsiderando o éxon adicional presente em *GLS*, as principais diferenças entre as sequências codantes de ambos os genes se encontram nos éxons localizados nas extremidades dos genes. Por exemplo, os éxons 1 compartilham 62,5% de similaridade entre si, porém codificam para 129 aminoácidos em KGA e apenas 61 aminoácidos em GAB. Estas sequências codificadas pelo éxon inicial contém os sinais envolvidos no direcionamento mitocondrial e processos de translocação (Shapiro et al. 1991; Gómez-Fabre et al. 2000). Do mesmo modo, o éxon 19 de *GLS* e o éxon 18 de *GLS2*, que codificam para a região C-terminal de ambas, apresenta a menor similaridade sequencial (29,4%). Foi demonstrado que esta região da proteína GAB está envolvida no reconhecimento de módulos de interação PDZ (Olalla et al. 2001), enquanto que em KGA, a porção equivalente sinaliza para ubiquitinação, via reconhecimento do motivo KEN (Colombo et al. 2010). Nota-se que as diferenças mais significativas entre as regiões codantes de *GLS* e *GLS2* compreendem motivos ou domínios envolvidos em direcionamento a organelas e interações proteína-proteína, o que pode explicar, pelo menos em parte, as diferenças de função e regulação. Por sua vez, os éxons 3-17 dos transcritos de mRNA de *GLS* e *GLS2* tem o mesmo comprimento e apresentam alta similaridade sequencial (78%).

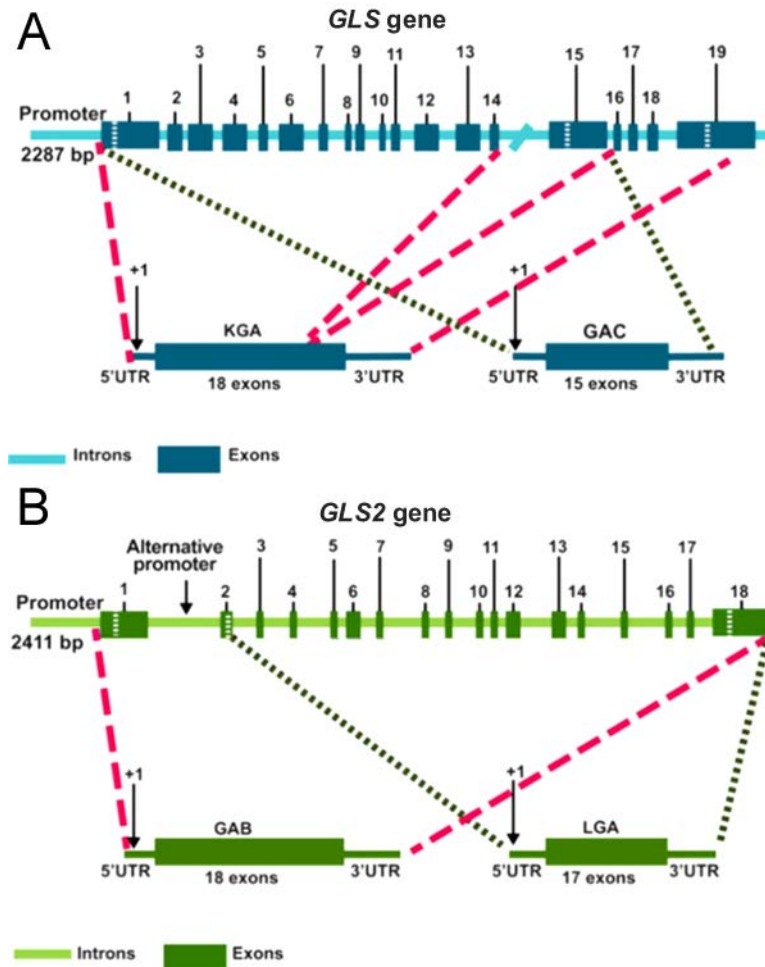


Figura 1. Transcritos de mRNA dos genes humanos de glutaminases. **(A)** Gene GLS humano e transcritos alternativos KGA e GAC. **(B)** Gene GLS2 humano e transcritos alternativos GAB e LGA. Cada gene é representado com seus íntrons em linhas sólidas e éxons em caixas enumeradas. As regiões promotoras também são indicadas na extremidade 5' de cada gene, incluindo o promotor alternativo do gene GLS2 no íntron 1. Linhas rosas tracejadas indicam os éxons que formam os transcritos de KGA e GAB, e as linhas verdes escuras pontilhadas compreendem os éxons envolvidos na geração dos transcritos GAC e LGA. O sítio de início da transcrição é marcado por uma seta e enumerado como +1. Imagem adaptada de Márquez, Matés, & Campos-sandoval 2016.

De maneira geral, desde bactérias até eucariotos, o domínio glutaminase canônico e autônomo consiste de uma estrutura globular compacta, tipicamente compreendida por aproximadamente 300 aminoácidos e dividida em dois subdomínios (Brown et al. 2009). Um dos subdomínios é inteiramente formado por α -hélices, enquanto que o outro é misto, contendo tanto α -hélices quanto folhas- β . Na junção entre os dois subdomínios é formado o bolsão catalítico, que abriga o resíduo de serina característico do sítio ativo (Figura 2). Todavia, sabe-se atualmente que as glutaminases humanas são enzimas mais complexas em termos de arquitetura, possuindo estruturas com domínios adicionais flanqueando o domínio glutaminase, conforme representado na Figura 3.

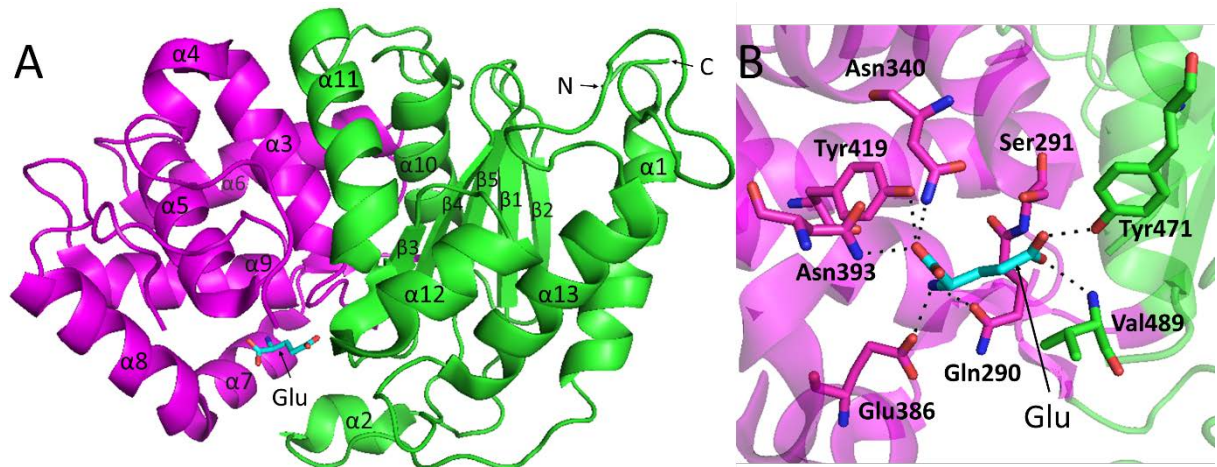


Figura 2. A estrutura do domínio glutaminase apresenta dois subdomínios e o sítio ativo está localizado na interface de ambos. **(A)** A estrutura cristalina de GAC de camundongo em complexo com glutamato (Glu) obtida por nosso grupo (PDB 3SS5) está representada em *cartoon*. O domínio I (Ile226-Pro286 e Cys429-Leu538, em verde) é composto por uma folha- β de cinco cadeias antiparalelas ($\beta 2 \downarrow \beta 1 \uparrow \beta 5 \downarrow \beta 4 \uparrow \beta 3 \downarrow$) cercada por seis α -hélices e diversos *loops*. O domínio II (Phe287-Thr428, em magenta) consiste basicamente de sete α -hélices. **(B)** L-Glutamato faz ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo; o grupamento amino da cadeia principal se liga a Glu386, Asn340, Tyr419 e Asn393; no ramo de cadeia lateral, a porção carboxila faz interações polares com Ser291, Tyr471 e o nitrogênio da cadeia principal de Val489.

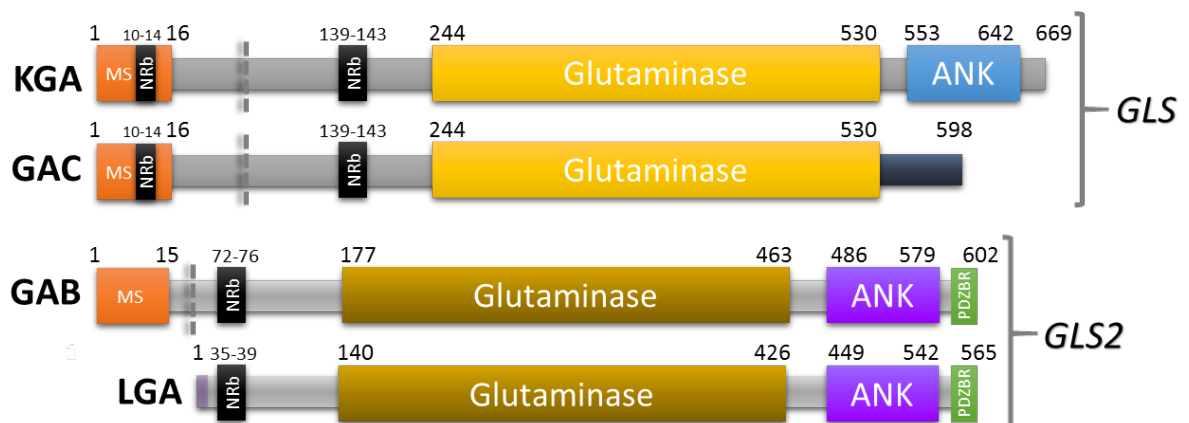


Figura 3. Representação dos multidomínios das glutaminases KGA, GAC, GAB e LGA, codificadas pelos genes *GLS* (2q32.2) e *GLS2* (12q13.3). Os números indicam as posições na sequência primária de aminoácidos de cada proteína. A linha tracejada indica a região de processamento das glutaminases imediatamente após sua entrada na mitocôndria. MS: *mitochondrial signaling sequence*. NRb: *nuclear receptor box* (motivo LXXLL, L= leucina e X = aminoácido qualquer). ANK: domínio formado por repetições de anquirina. PDZ-br: PDZ (PSD95/Dlg/ZO1) *binding region*.

O comportamento cinético distinto das isoenzimas GLS e GLS2 é comumente utilizado para distinguir entre as isoformas de glutaminases humanas. As eficiências catalíticas das isoformas GLS são consideravelmente aumentadas na presença de fosfato inorgânico (P_i), enquanto que o acúmulo do produto da catálise, Glu, causa inibição (Curthoys et al. 1976; Curthoys & Watford 1995; Elgadi et al. 1999). Em constraste, ambas as isoformas GLS2 são insensíveis ao P_i (A. Cassago et al.

2012) e não apresentam inibição por Glu (Martín-Rufián et al. 2012; Campos-Sandoval et al. 2007).

As principais diferenças cinéticas foram observadas em relação à dependência do ativador P_i , que é baixa para GLS2 e alta para GLS; à relativa afinidade pelo substrato Gln, que é maior em GLS do que nas isoformas GLS2; e ao efeito inibitório de Glu, uma característica única reportada apenas para as isoenzimas GLS (Kovacevic & McGivan 1983; Curthoys & Watford 1995). O mecanismo através do qual o P_i ativa as enzimas GLS foi demonstrado por nosso grupo a partir de dados estruturais de cristalografia de raios X da proteína GAC (Cassago et al. 2012). O P_i se liga no interior do bolsão catalítico, resultando na estabilização alostérica dos tetrâmeros e facilitando a entrada do substrato por competir com o produto, Glu, garantindo a ciclagem da enzima. Esta competição de P_i *versus* Glu pela ligação ao sítio ativo explica a diminuição do efeito inibitório de Glu na presença de concentrações crescentes de P_i (Shapiro, Morehouse, & Curthoys 1982).

Na presença de P_i , tanto KGA quanto GAC sofrem polimerização específica e extensiva (Olsen et al. 1970; Godfrey, Kuhlenschmidt, & Curthoys 1977; Ferreira et al. 2013). Além disso, o equilíbrio tetrâmero-dímero é dependente de concentração, conforme demonstrado para a isoforma GAC, a qual sofre polimerização mesmo na ausência de P_i , apenas elevando-se a concentração da enzima (Ferreira 2013). Há uma correlação direta entre a tendência de oligomerização e os níveis de atividade das isoenzimas GLS, sendo GAC a enzima mais ativa e com maior capacidade de se polimerizar. Deste modo, o inibidor GLS-específico, BPTES [*bis*-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide], atua justamente de modo a prevenir a formação dos superoligômeros induzidos por P_i (Robinson et al. 2007; Cassago et al. 2012). O mecanismo de inibição foi elucidado a partir de dados estruturais das isoformas GLS cristalizadas. A inibição por BPTES é alcançada através de um mecanismo não competitivo que interfere na ativação alostérica induzida por P_i : o domínio glutaminase de KGA humana forma um tetrâmero altamente simétrico contendo duas moléculas de BPTES que estão posicionadas nas interfaces dímero-dímero; a ligação do BPTES desencadeia uma mudança conformacional dos resíduos do sítio ativo e congela a enzima em um tetrâmero inativo estável (Thangavelu et al. 2012; DeLaBarre et al. 2011; Ferreira et al. 2013).

A estrutura multidomínios das glutaminases de mamíferos (Figura 3) é uma evidência da provável multifuncionalidade destas proteínas (Márquez et al. 2006). Além do domínio catalítico, funcional e estruturalmente bem caracterizado, as glutaminases apresentam regiões N- e C-terminais contendo motivos e sequências que podem estar envolvidos em funções diversas. Os 15 primeiros aminoácidos localizados no N-terminal das isoformas de glutaminase, com exceção da variante LGA, correspondem à sequência de sinalização mitocondrial. O sítio de iniciação da transcrição e o promotor alternativo de LGA estão contidos no íntron 1 do gene *GLS2*, portanto, esta isoforma não contém o éxon 1, onde se localiza o peptídeo sinal. De fato, análises de bioinformática da proteína LGA humana não encontraram uma sequência de sinalização mitocondrial no N-terminal, entretanto, um peptídeo sinal secretório foi predito para os 16 primeiros aminoácidos da proteína LGA transcrita a partir do segundo ATG (Martín-Rufián et al. 2012).

Ainda na região N-terminal, todas as quatro isoformas de glutaminase apresentam um motivo de interação com receptores nucleares (NR *box*, LXXLL): a sequência LEDLL nas isoformas GLS (resíduos 139 – 143) e LGDLL para GLS2 (resíduos 72 – 76 de GAB e 35 – 39 de LGA). A existência de resíduos carregados flanqueando motivos NR *box* parece contribuir para a afinidade da interação de coativadores com receptores nucleares (Bramlett, Wu, & Burris 2001), condição que também é atendida pelas glutaminases. Em GLS, existem lisinas localizadas a N-terminal (posições 130 e 132 de GLS humana) e ácidos glutâmicos a C-terminal (posições 149 e 152 de GLS humana) do motivo NR *box*; em GLS2, há uma arginina a N-terminal (posição 71 de GAB humana) e dois ácidos glutâmicos a C-terminal (posições 82 e 85 de GAB humana) do motivo.

A partir do resíduo 76 de GLS humana, o N-terminal se assemelha estruturalmente ao domínio EF-*hand*, formado por motivos do tipo hélice-*loop*-hélice, no qual o *loop*, usualmente formado por 12 resíduos, apresenta sítios de ligação a íons Ca^{2+} . Domínios EF-*hand* estão presentes em proteínas como calmodulina (CaM, *calcium-modulated protein*), envolvida em sinalização celular (Stevens 1983), e troponina-C, importante componente da contração muscular esquelética e cardíaca (Gomes, Potter, & Szczesna-Cordary 2002). Proteínas contendo este domínio estão sujeitas a mudanças conformacionais cálcio-dependentes que expõem sítios de ligação a peptídeos alvos (Lewit-Bentley & Réty 2000). Entretanto, apesar de sua

conformação estrutural *EF-hand-like*, as glutaminases de mamíferos não apresentam os resíduos necessários para a coordenação dos íons Ca^{2+} (Cassago et al. 2012). Portanto, até o momento, nenhuma função foi descrita para esta região.

Na porção central das glutaminases, encontra-se o domínio catalítico, que é altamente conservado desde bactérias até seres humanos (Brown et al. 2009), como já mencionado acima. Por sua vez, o C-terminal de glutaminases de mamíferos, com exceção de GAC, apresenta motivos conhecidos de interação proteína-proteína denominados repetições ANK (revisado no tópico 1.2 adiante). O C-terminal único de GAC, por sua vez, é formado por 47 resíduos e corresponde a uma região conformacionalmente heterogênea, que não pôde ser modelada nas análises estruturais de raios X (Cassago et al. 2012). Até o momento, nenhuma função foi atribuída para a região C-terminal de GAC.

A região C-terminal de glutaminases mamíferas com exceção de GAC também apresenta motivos denominados *KEN box*, cujas letras representam a sequência de aminoácidos (lisina – ácido glutâmico – asparagina) que o compõe. Os substratos do ciclossomo/complexo promotor de anáfase E3 ubiquitina ligase ligado à sua proteína ativadora Cdh1 (APC/C-Cdh1) são direcionados para degradação através de motivos de reconhecimento específicos, entre os quais, o *KEN box* (Pfleger & Kirschner 2000). Foi demonstrado que GLS é substrato de APC/C-Cdh1 em linfócitos T proliferativos (Colombo et al. 2010).

Conforme mencionado anteriormente, os últimos 4 aminoácidos da extremidade C-terminal de GAB humana, ESMV, correspondem a uma sequência consenso necessária para a interação com proteínas contendo domínio PDZ, um dos módulos mais comuns envolvidos em interações *scaffolding*, uma vez que se ligam às proteínas alvo e desencadeiam a formação de complexos funcionais específicos na membrana (Kornau et al. 1995). Até o momento, foram identificadas duas proteínas contendo domínio PDZ e que são parceiras de interação de GAB: α -1-sintrofina (SNT) e *glutaminase-interacting protein* (GIP) (Olalla et al. 2001). Segundo Márquez et al. (2009), a hipótese de GLS2 cerebral sendo regulada por proteínas PDZ é atraente porque pode fornecer um mecanismo de controle tanto da síntese de glutamato quanto do direcionamento de glutaminase cerebral a compartimentos celulares extra-mitocondriais, como o núcleo, onde GLS2 já foi localizada (Olalla et al. 2002).

1.2. Repetições de anquirina.

Considerando que este trabalho envolveu o estudo do domínio *ankyrin* (ANK) de KGA, atenção especial para este domínio será dada nesta subseção. A existência de domínios do tipo *ankyrin repeat* no C-terminal de KGA e das isoformas GLS2 foi detectada por análise de bioinformática da sequência proteica primária (Figura 3). *ANK repeat* é um motivo de 33 resíduos que se dobra em uma estrutura do tipo hélice-loop-hélice com um β -*hairpin* projetando-se para fora das hélices em um ângulo de 90° (Figura 4). As repetições se empilham umas sobre as outras de modo a formar uma estrutura em formato de L. Este motivo foi primeiramente identificado para o regulador de ciclo celular Swi6/Cdc10 de levedura e para a proteína sinalizadora Notch de *D. melanogaster* (Breedon & Nasmyth 1987), sendo posteriormente apontado em proteínas pertencentes aos três domínios, *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, assim como em diversos genomas virais. Entretanto, a maioria das proteínas contendo ANK são encontradas em eucariotos, sendo a maior parte delas composta por quatro a seis repetições, mas podendo repetir-se até 34 vezes, conforme predito para uma proteína de *Giardia lamblia* (Mosavi et al. 2004).

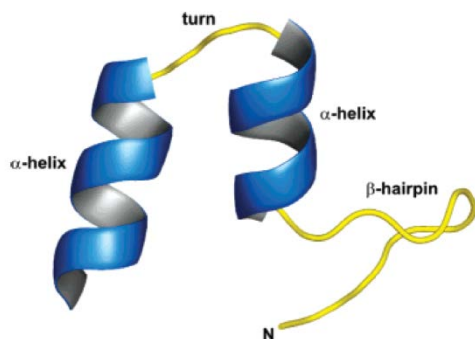


Figura 4. Representação do motivo ANK *repeat* canônico, contendo 33 resíduos de aminoácidos. Sua estrutura secundária consiste de um β -*hairpin* e duas α -hélices separadas por um *turn* (ou *loop*). Retirada de Otyepka et al. 2006.

Foram encontradas repetições ANK em uma grande variedade de proteínas envolvidas em diversas funções e vias metabólicas, incluindo sinalização celular, modificação proteica, integridade de citoesqueleto, regulação de transcrição e de ciclo celular, resposta inflamatória e transporte de íons (Mosavi et al. 2004). Tais motivos configuram-se como plataformas comuns de interação proteína-proteína, principalmente, através de sua superfície interna côncava, formada pela região de β -*hairpin* e pelas hélices internas (Figura 5).

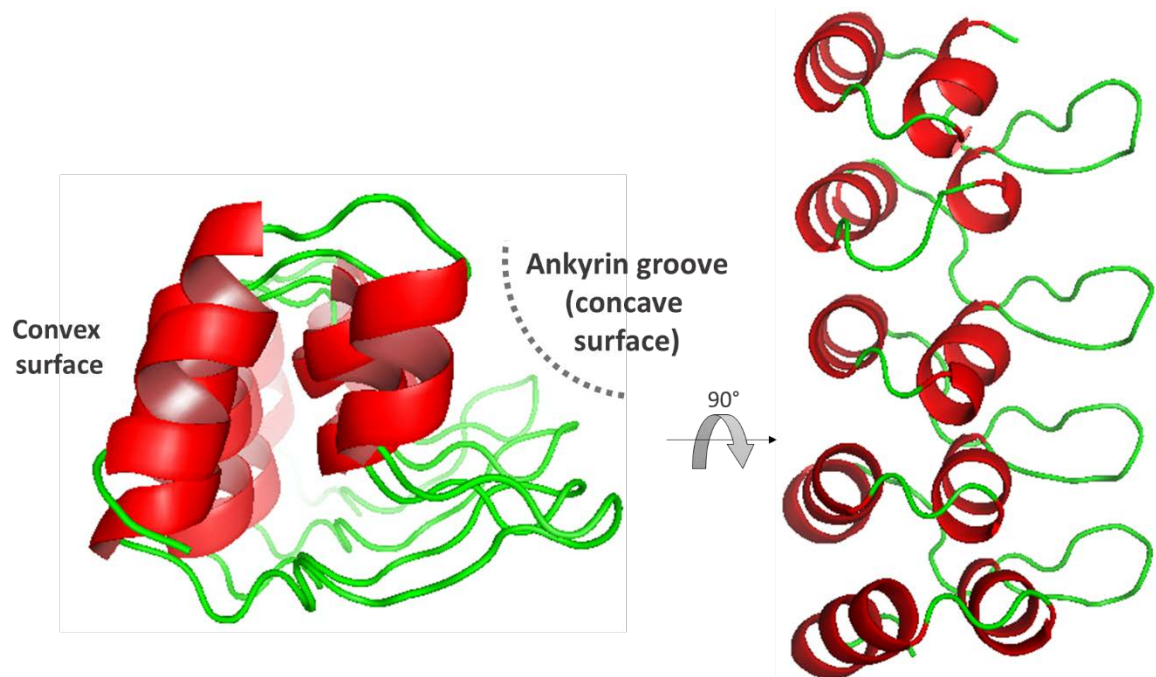


Figura 5. Estrutura cristalina da proteína p18-INK4c (PDB 1IHB) contendo 5 ANK *repeats*. Neste exemplo típico de um domínio ANK, está representada a superfície côncava de interação proteína-proteína, denominada *ANK groove*, formada pelas hélices internas e pela região de β -hairpin do conjunto de repetições.

A arquitetura modular e as superfícies moleculares variáveis geradas pela união de múltiplas repetições tornam as proteínas que contém ANK altamente versáteis na interação com outras proteínas. Os resíduos de superfície expostos ao solvente não se relacionam a nenhum elemento em particular da estrutura secundária do domínio ANK e podem variar entre diferentes proteínas. Logo, conforme as unidades estruturais repetitivas se empilham para formar uma molécula alongada, os resíduos de superfície das várias repetições justapostas formam uma ampla superfície acessível ao solvente e disponível a parceiros específicos. Desse modo, a interação de uma proteína ANK com seu parceiro resulta do acúmulo de contatos envolvendo diversos resíduos, os quais estão descontinuamente dispersos pela molécula, conforme observado em complexos com estruturas cristalinas resolvidas (Batchelor et al. 1998; Gorina & Pavletich 1996; Russo et al. 1998; Jacobs & Harrison 1998; Wilson & Kovall 2006). Isso faz com que a ligação delas a seus alvos seja específica, apesar da semelhança sequencial global entre as proteínas ANK.

Os domínios ANK diferem de outros domínios de ligação proteína-proteína por não reconhecerem sequências alvo específicas, além de a ligação mediada por ANK envolver regiões descontínuas de resíduos dispersos tanto na proteína ANK quanto

em seu alvo. Li, Mahajan, & Tsai (2006) comparou o mecanismo de interação dos domínios ANK com a associação dos fragmentos Fv e Fab com antígenos. Anticorpos têm estruturas similares, mas regiões Fv distintas. Assim, os vários resíduos das regiões Fv acessíveis ao solvente se juntam para formar uma superfície ampla e livre para o reconhecimento específico de antígenos (Li, Mahajan, & Tsai 2006).

ANK repeat consiste de um dos motivos repetitivos mais comuns presentes em proteínas, juntamente com *leucine rich* (LRR), *armadillo* (ARM), HEAT (*Huntingtin*; *Elongation factor 3*; subunidade A de PP2A; IOR) e *tetratricopeptide* (TRP) repeats. Tais motivos constituem as unidades repetitivas dos chamados domínios de repetição em tandem e consistem de 20-60 aminoácidos que se dobram em estruturas simples, contendo α -hélices ou folhas- β (Grove, Cortajarena, & Regan 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Domínios de repetição em tandem e suas características. Modificado de Grove, Cortajarena, & Regan 2008.

Domínio de repetição	Número de aminoácidos por repetição	Motivo estrutural de uma repetição	Faixa de números de repetições para proteínas naturais (número mais comum)
ANK	33	Hélice-hélice-loop (ou β -hairpin) (H1, H2)	3-34 (6)
LRR	20-29	Folha- β -loop-hélice	Até 28
Armادillo	42	Três α -hélices (H1, H2, H3)	6-15 (12)
HEAT	37-47	Duas α -hélices (A & B)	3-36
TPR	34	Hélice-turn-hélice (A & B)	3-16 (3)
WD40*	40-60	Quatro folhas- β antiparalelas (a-d)	3-16 (7-8)

*também conhecidos como WD ou *beta-transducin repeats*, são motivos frequentemente terminados em Trp-Asp (WD).

1.3. Glutaminases e desenvolvimento do câncer.

Gln é o aminoácido mais abundante no plasma humano, perfazendo mais de 20% do *pool* de aminoácidos livres no sangue e 40% no músculo (Bergström et al. 1974). A manutenção de altos níveis de Gln no sangue fornece uma fonte pronta de carbono e hidrogênio para biossíntese, energética e homeostase celulares que pode ser explorada por células tumorais para impulsionar o crescimento tumoral (DeBerardinis & Cheng 2010; Levine & Puzio-Kuter 2010). Após entrar nas células, Gln deve seguir entre dois caminhos: (a) contribuir para a biossíntese de nucleotídeos e de uridina difosfato N-acetilglicosamina (UDP- GlcNAc); (b) ser convertida a Glu pelas glutaminases (GLS ou GLS2) (Figura 6). Glu, por sua vez, pode contribuir para a síntese de glutatona e tem papel fundamental como precursor ou substrato para a

síntese de vários aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleotídeos e metabólitos (recentemente revisado em Yelamanchi et al. 2016) (Figura 6). Portanto, o metabolismo de Gln é importante para o reabastecimento do reservatório de intermediários do ciclo do TCA (anaplerose), os quais são removidos da mitocôndria para participar das reações de biossíntese (cataplerose) (Owen, Kalhan, & Hanson 2002).

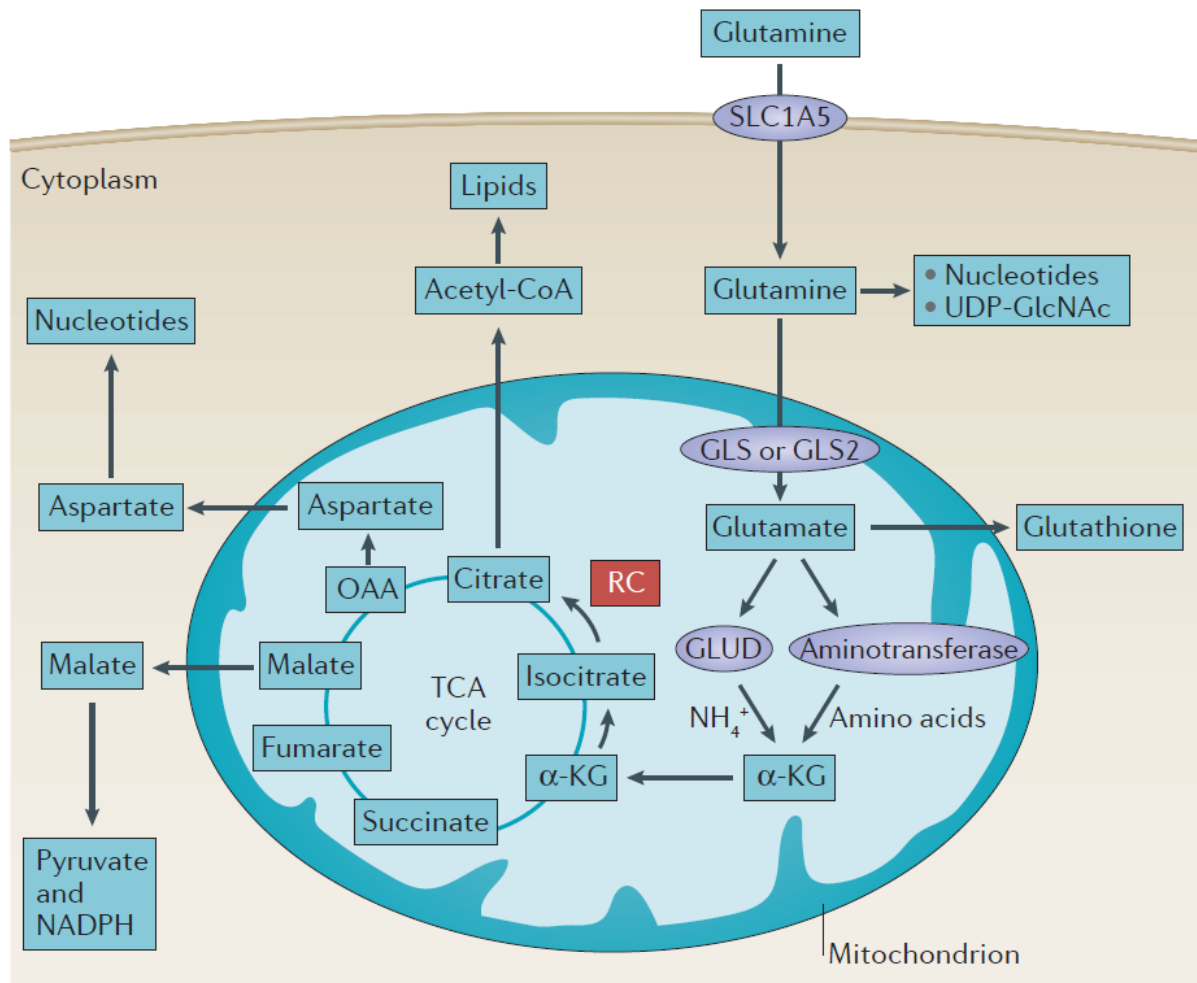


Figura 6. Principais destinos metabólicos e biossintéticos de Gln. Ao entrar na célula através de transportadores como SLC1A5, Gln pode ser utilizada na síntese de nucleotídeos e uridina difosfato N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) ou ser convertida em Glu pelas glutaminases. Por sua vez, Glu contribui para a síntese de glutatona ou é convertida em α-cetoglutarato (α-KG) através de duas enzimas diferentes: glutamato desidrogenase (GLUD) ou aminotransferases, cujos subprodutos de catálise são, respectivamente, NH₄⁺ e aminoácidos. α-KG entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o qual fornece elétrons para a cadeia transportadora da mitocôndria na geração de ATP através da geração de NADH e FADH₂. Oxaloacetato (OAA) pode ser convertido em aspartato para a síntese de nucleotídeos. Alternativamente, α-KG pode ser usado na produção de acetil-CoA e lipídeos através do processo chamado de carboxilação redutiva (RC). Imagem retirada de Altman, Stine, & Dang 2016.

A importância da glutaminólise para a manutenção do fenótipo maligno coloca as glutaminases na posição de alvos terapêuticos potenciais para o tratamento

do câncer. A expressão de GAC, a isoforma GLS mais ativa, é aumentada em diversos tipos de câncer, sugerindo que o *splicing* alternativo do gene *GLS* contribua para um fluxo glutaminolítico mais elevado em câncer (Van Den Heuvel et al. 2012; Cassago et al. 2012; Timmerman et al. 2013; Gross et al. 2014; Xia et al. 2014; Redis et al. 2016). Por sua vez, GLS2 parece ter uma função mais complexa em câncer. GLS2 é induzida pelo supressor tumoral p53 e tem características supressoras de tumor contra gliomas, glioblastomas, câncer de pulmão e hepatocarcinomas, reduzindo proliferação, migração e formação de colônia *in vitro* (Suzuki et al. 2010; Hu et al. 2010; Szeliga et al. 2014; Szeliga & Albrecht 2015). GLS2 também exibe habilidades supressoras de tumor através da regulação negativa da sinalização por PI3K/AKT, sendo que a expressão de GLS2 foi associada com maior taxa de sobrevivência de pacientes HCC (hepatocarcinoma celular) (Liu et al. 2014). Um estudo recente mostrou que GLS2 sequestra a *small* GTPase Rac1 de modo a suprimir metástase (Zhang et al. 2016). Além disso, foi demonstrado que GLS2 tem a função de inibir migração e invasão em células HCC via Dicer-miR-34a-Snail, a partir de sua interação direta com a proteína Dicer (Kuo et al. 2016). A consequente estabilização de Dicer facilita a maturação de miR-34a que, por sua vez, reprime a expressão da proteína Snail, fator de transcrição envolvido em processos de transição epitélio-mesênquima (EMT) (Kuo et al. 2016; Wang & Shang 2013). Entretanto, GLS2 parece apoiar crescimento e promover resistência a radiação ionizante em alguns tipos de câncer (Xiang et al. 2013). Adicionalmente, GLS2 foi apontada como alvo crucial da oncoproteína N-Myc em neuroblastoma (Qing et al. 2012; Xiao et al. 2015).

Muitos oncogenes e supressores tumorais, tais como Myc (Wise et al. 2008), Ras (Gaglio et al. 2011), Rho GTPases (Wang et al. 2010), TGF β (S. Y. Lee et al. 2016), PTEN (Garcia-Cao et al. 2012) e p53 (Suzuki et al. 2010) foram descritos como envolvidos no metabolismo de Gln glutaminase-dependente. Notavelmente, o fator de transcrição oncogênico Myc estimula a captação e degradação de Gln por GLS para sustentar a viabilidade celular e a anaplerose do ciclo de Krebs (Wise et al. 2008). Conhecido por regular miRNAs (Chang et al. 2008) e estimular proliferação celular (Eilers & Eisenman 2008), Myc reprime a transcrição de miR-23a e miR-23b, resultando em expressão aumentada de seu alvo, *GLS*, e consequentemente, na regulação positiva do catabolismo de Gln (Gao et al. 2009). miRNAs desempenham papel central na regulação pós transcricional da expressão gênica ao anelar nas

regiões 3' não traduzidas dos mRNAs alvos para promover a degradação do transcrito ou a repressão de sua tradução (Chhabra, Dubey, & Saini 2010). Similarmente, em células leucêmicas humanas cultivadas em Gln, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) p65 intensificou o metabolismo de Gln ao diminuir a expressão de miR-23a através de sua ligação direta ao promotor gênico (Rathore et al. 2012).

Transformação dirigida pelo oncogene K-ras também mostrou induzir dependência a Gln para promover crescimento e sobrevivência (Weinberg et al. 2010; Gaglio et al. 2011). Inibição do metabolismo de Gln pelo *knockdown* de *GLS* foi suficiente para comprometer crescimento de câncer dirigido por K-ras, indicando uma vulnerabilidade metabólica (Son et al. 2013). Por sua vez, o fator de transcrição oncogênico c-Jun foi identificado como regulador primário da expressão de *GLS* em células de câncer de mama, sendo capaz de se ligar diretamente à região promotora do gene *GLS* e elevar a sua expressão (Lukey et al. 2016).

1.4.O receptor nuclear PPAR γ como um possível parceiro de interação das glutaminases GLS.

Em vista da aparente multifuncionalidade das isoformas de glutaminases humanas, nosso grupo de pesquisa tem direcionado esforços no sentido de investigar o papel destas enzimas, em especial, no contexto tumoral. Uma das abordagens utilizadas envolve a identificação e caracterização de interações com outras proteínas de relevância no metabolismo celular. Entre os parceiros identificados por nosso grupo, está o receptor nuclear PPAR γ .

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) compõem uma importante subfamília da superfamília de receptores nucleares de hormônios (NHR). Estes fatores de transcrição ativados por ligantes têm sido relacionados a diversos processos metabólicos, como homeostase de lipídeos e glicose, controle de proliferação celular e diferenciação (Escher & Wahli 2000). O nome PPAR deriva da clonagem inicial de uma das isoformas – PPAR α – como alvo de vários compostos xenobióticos responsáveis por induzir a proliferação de peroxissomos no fígado (Issemann & Green 1990). Além de PPAR α , outras duas

isoformas já foram identificadas: PPAR γ e PPAR δ (também referido como PPAR β) (Figura 7).

Figura 7. Esquema dos isotipos humanos de PPAR β/δ , PPAR α e PPAR $\gamma_{1/2}$. DBD: *DNA binding domain*; LBD: *ligand binding domain*. Os números mostrados na parte superior de cada receptor representam as posições dos aminoácidos e, dentro das caixas, estão as porcentagens de identidade em relação ao primeiro isotipo (PPAR β/δ). Adaptado de Rosen & Spiegelman 2001.



PPAR γ é a isoforma mais extensamente estudada, devido ao seu papel central em diversos processos metabólicos de grande interesse básico e clínico, como adipogênese, sensibilidade a insulina, inflamação, diabetes do tipo 2, aterosclerose e câncer (Mansour 2014; Robbins & Nie 2012; Lehrke & Lazar 2005; Yasmin & Jayaprakash 2016; Murphy & Holder 2000; Krishnan, Nair, & Pillai 2007). PPAR γ apresenta duas isoformas criadas por *splicing* alternativo na porção 5' do gene. PPAR γ_2 contém 30 aminoácidos adicionais no N-terminal em relação a PPAR γ_1 . Enquanto muitos tecidos – incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço – expressam PPAR γ_1 em baixos níveis (Fajas et al. 1997), PPAR γ_2 é seletivo ao tecido adiposo, onde apresenta altos níveis de expressão (Tontonoz et al. 1994).

PPAR γ apresenta uma estrutura modular típica de receptores nucleares (Figura 8). Na região N-terminal, existe o domínio de ativação autônoma da função (AF-1), responsável por interagir com proteínas co-reguladoras. O domínio de ligação ao DNA (DBD) apresenta dois *zinc-fingers* responsáveis pela ligação seletiva aos PPREs (Elementos Responsivos aos Proliferadores de Peroxissomo) na região promotora dos genes alvo de PPAR γ . PPREs são sequências de DNA específicas formadas por hexanucleotídeos repetitivos separados por 1 ou 2 nucleotídeos que especificamente ancoram o PPAR γ dimerizado ao RXR (Receptor do ácido 9-cis-retinóico) (Gearing et al. 1993). Por sua vez, a região *hinge* modula a afinidade de ligação ao DNA estando envolvida em interações com co-repressores e coativadores (Luconi, Cantini, & Serio 2010). Já, o domínio de ligação ao ligante (LBD) contém a segunda função de ativação (AF-2), cuja interação com ligantes promove interação

com DNA e mudanças conformacionais no LBD que controlam o recrutamento de co-reguladores transcricionais para a superfície deste domínio (Nettles & Greene 2005).

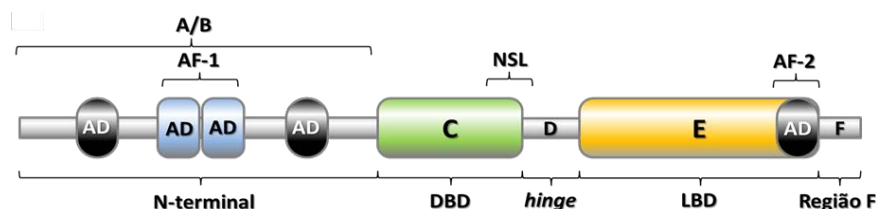


Figura 8. Representação esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. C (em verde) e E (em amarelo) representam os domínios

estruturalmente conservados, DBD e LBD, respectivamente; as barras cinzas ilustram as regiões menos conservadas A/B, D e F. A região F C-terminal, ausente em alguns receptores, tem função pouco compreendida. Duas funções de ativação da transcrição (AFs) foram descritas para vários receptores nucleares: AF-1, constitutivamente ativa, presente na região A/B, e AF-2 induzida por ligante e encontrada na região E (hélice 12). Dentro destas AFs, foram descritos domínios autônomos de transativação (AD) para receptores como o de estrogênio (em caixas azuis) e progesterona (em caixas pretas). NSL: sinal de localização nuclear (Shiau et al. 1998; Olefsky 2001).

PPAR γ é ativado por ligantes de baixa afinidade derivados de ácidos graxos de cadeia longa – e.g. ácido hidroxi-octadecaenóico (HODE) (Nagy et al. 1998), 15-desoxi-12,14-prostaglandina J2 (15-dPGJ2) (Desvergne & Wahli 1999) – e por um painel de potentes drogas agonistas que incluem as tiazolidinedionas (TZDs) rosiglitazona (RGZ) e pioglitazona, ainda comercializadas nos EUA como sensibilizadoras de insulina para o tratamento de diabetes mellitus do tipo II. Entretanto, RGZ foi retirada do mercado em 2010 no Brasil e na Europa por determinação da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e da EMEA (*European Medicines Agency*), respectivamente, devido aos riscos cardiovasculares a ela associados (Chen, Yang, & Zhai 2012; Nissen & Wolski 2010). A ligação de seus ligantes ao domínio LBD permite a heterodimerização, ligação ao DNA, liberação de co-repressores (NCoRs), recrutamento de coativadores e transativação de promotores. Proteínas coativadoras são as responsáveis por recrutar o aparato basal de transcrição, além de funcionar como *scaffolds* para outros co-reguladores e tornar a cromatina acessível através da acetilação de histonas e outras modificações pós traducionais.

Do ponto de vista mecanístico, a interação com ligantes agonistas promove efeitos alostéricos que levam ao reposicionamento da última hélice do LBD, a H12, permitindo a interação de coativadores através do motivo LXXLL (*NR box*) (Figura 9A). As cadeias laterais das leucinas, formando a face hidrofóbica da hélice, reconhecem

a fenda hidrofóbica formada por H3, H4 e H12 na superfície do LBD. Ao mesmo tempo, dois resíduos altamente conservados presentes no LBD, um resíduo de lisina positivamente carregado (em H3) e um resíduo de ácido glutâmico negativamente carregado (região AF-2 de H12), localizados em lados opostos da fenda contribuem para um grau adicional de seletividade ao travar as extremidades N- e C-terminais do motivo LXXLL por ligações de hidrogênio com a cadeia principal da hélice – mecanismo conhecido como “*charge clamp*” (Nolte et al. 1998; Shiau et al. 1998).

Em contraste, ligantes antagonistas contêm um grupamento que se estende para a superfície do LBD e desloca a hélice H12, revelando à superfície um sulco hidrofóbico mais longo formado pelas hélices H3 e H4 que é reconhecido pelo chamado *CoRNR box* (*corepressor nuclear-receptor box*) presentes em co-repressores transcrpcionais, como SMRT e NCoR (Figura 9B) (Xu et al. 2002). Estes, por sua vez, são responsáveis por recrutar complexos de histona desacetilases e tornar a cromatina compacta e transcrionalmente silenciosa (Perissi & Rosenfeld 2005).

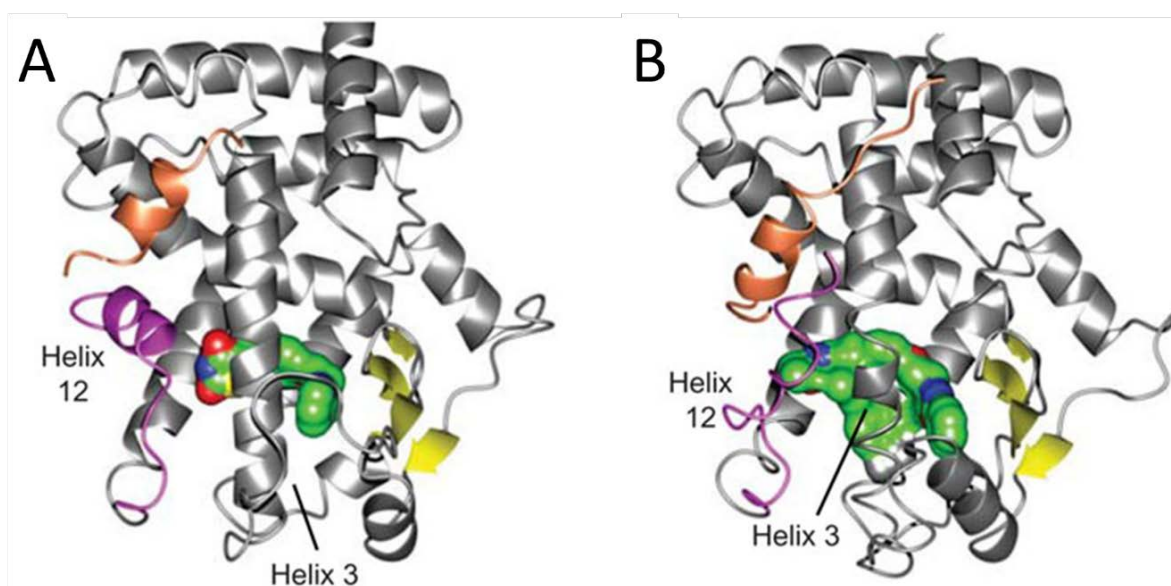


Figura 9. As mudanças na conformação da hélice 12 regulada por ligantes determina a atividade transcricional de receptores nucleares. **(A)** O LBD de PPARγ é representado em *ribbon* com a hélice 12 em roxo e a folha-β em amarelo, associado a um peptídeo coativador (em laranja). O ligante RGZ está mostrado em *surface rendering* (PDB 2PRG). **(B)** A estrutura de PPARα ligada a um antagonista sintético está representada em *surface rendering* e, neste caso, a fita laranja é um peptídeo do co-repressor SMRT (PDB 1KKQ). Retirada de Nettles 2008.

1.5. Interação entre KGA e PPAR γ : *Background experimental.*

A interação entre KGA e PPAR γ tem sido um dos principais focos de estudo do nosso grupo de pesquisa, desde a sua descoberta por duplo híbrido em levedura pelo então pós-doutorando Dr. Marcel Nakahira. Novos ensaios de duplo híbrido foram realizados para identificar os domínios de KGA e PPAR γ envolvidos na interação (Gomes 2013; Cassago 2016). Foi demonstrado que a interação das duas proteínas ocorre via LBD de PPAR γ e N-terminal de KGA (Figura 10). Considerando a presença de dois motivos do tipo *NR box*, identificados por análises da sequência primária de KGA, decidimos testar a hipótese de sua participação na interação com PPAR γ , também através de ensaios de duplo-híbrido (Figura 11). Assim, foi demonstrado que a primeira sequência LXXLL, localizada entre os resíduos 10-14, parece estar envolvida na interação.

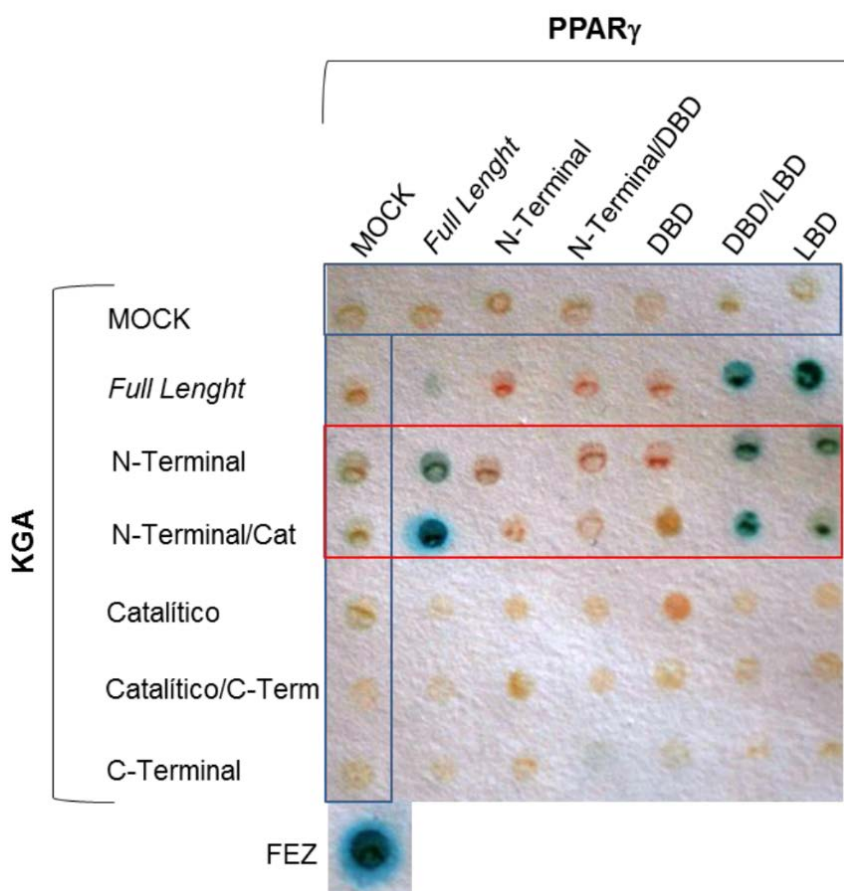


Figura 10. Identificação dos domínios de KGA e PPAR γ envolvidos na interação entre as duas proteínas por duplo-híbrido em levedura. O *mock* (representado pelo retângulo azul) indica que os domínios de PPAR γ e KGA co-transformados com vetores vazios não são capazes de se auto-ativar. O domínio N-terminal de KGA é o responsável por interagir com o domínio LBD de PPAR γ , conforme indicado pelas colônias azuis. Colônias sem coloração indicam ausência de interação. A construção que expressa a proteína FEZ (*fasciculation and elongation protein zeta*) foi usada como controle positivo para este ensaio de beta-galactosidase. Retirada de Cassago 2016.

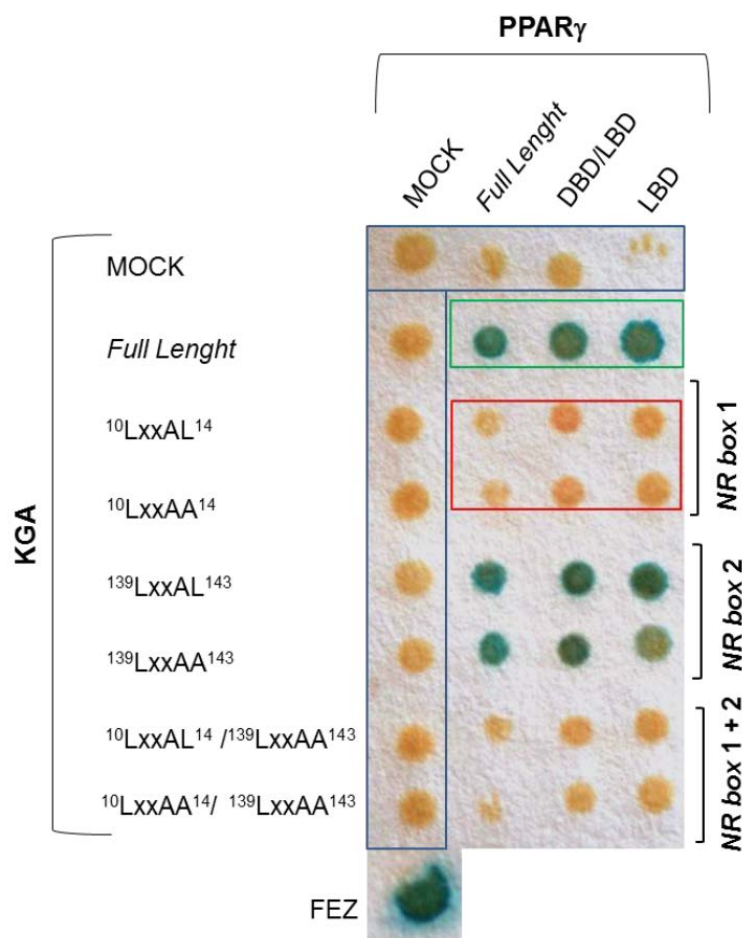


Figura 11. Identificação dos motivos do tipo NR box envolvidos na interação de KGA com o receptor PPAR γ utilizando o teste da β -galactosidase em papel filtro. Os domínios de PPAR γ que mostraram previamente interação com KGA foram co-transformados, na cepa L40 de *S. cerevisiae*, com a construção *full lenght* de KGA selvagem ou contendo as mutações nas sequências LXXLL presentes no N-terminal. Na caixa azul (*Mock*), os domínios de PPAR γ e as construções de KGA foram co-transformados com os vetores vazios (pBTM116KQ e pACT2), indicando que os domínios e mutantes não são capazes de se auto ativar. A caixa verde contém controles positivos, que são os domínios de ambas proteínas que mostraram interação previamente descritos. A caixa vermelha contém as colônias originárias da co-transformação de PPAR γ com as construções de KGA com mutações no 10 LXXLL 14 e mostra a participação decisiva deste motivo, em especial da leucina 13, na interação entre as proteínas. Retirada de Cassago 2016.

Com bases nestas evidências de interação direta entre as duas proteínas obtidas por duplo-híbrido, diversos esforços têm sido direcionados para sua caracterização, utilizando abordagens funcionais e bioquímicas.

2. Justificativa

As glutaminases têm sido tradicionalmente consideradas enzimas mitocondriais que executam um importante papel para o metabolismo de energia e nitrogênio em células de mamíferos. Conforme descrito anteriormente, diversos estudos têm relacionado diretamente a função das glutaminases com o consumo acentuado de Gln por células proliferativas.

Todavia, nos últimos anos, e em função de todos os domínios estruturais encontrados nessas proteínas, novos papéis funcionais têm sido associados às glutaminases através de abordagens genômicas e proteômicas, em especial, no contexto tumoral. As glutaminases parecem atuar como proteínas multifuncionais capazes de realizar diferentes tarefas. A existência de múltiplos transcritos, a descoberta de novas localizações extramitocondriais e a identificação de parceiros de interação isoforma-específicos são indícios de que estas enzimas estejam possivelmente entre as chamadas proteínas *moonlighting* – *i.e.* capazes de desempenhar funções adicionais não relacionadas ao seu papel metabólico descrito (Jeffery 1999). Por sua vez, uma melhor compreensão das diferenças entre as isoformas de glutaminases pode direcionar a busca por inibidores isoforma-específicos para o tratamento do câncer.

Portanto, a proposta deste trabalho foi avançar no entendimento das diferenças entre as múltiplas glutaminases de mamíferos, a partir de diferentes abordagens.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais.

Contribuir para o entendimento das diferenças evolutivas, estruturais e funcionais entre as diferentes isoformas de glutaminases humanas, com atenção especial para as possíveis implicações destas diferenças no metabolismo tumoral.

3.2. Objetivos específicos.

- Investigar a origem e evolução das glutaminases de mamíferos a partir de análises filogenéticas envolvendo todos os domínios da vida (bactérias, archaea e eucariotos) e propor um modelo evolucionário para os genes *GLS* e *GLS2*;
- Realizar estudos estruturais da isoforma KGA para determinação da estrutura do domínio C-terminal;
- Obter a estrutura cristalográfica de KGA madura contendo os três domínios, N-terminal, catalítico e C-terminal;
- Caracterizar a interação de KGA com o receptor nuclear PPAR γ utilizando abordagens bioquímicas e funcionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais.

4.1.1. Oligonucleotídeos.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na clonagem das subconstruções de KGA humana em pET-28a e mutagênese sítio-dirigida para inserção de *stop codon*.

Oligo	Sequência
hKGA V124 + sítio de <i>NdeI</i> (Forward)	5'-GCAGCCATATGGTGGCCTCAGGTGAAAATAAAATA-3'
hKGA I221 + sítio de <i>NdeI</i> (Forward)	5'-GGAATTCCATATGATTCCTGACTTTATGTCTTTTACC-3'
hKGA V551 + sítio de <i>NdeI</i> (Forward)	5'-GGGAATTCCATATGGTAAAGTCAGTGATAAATCT-3'
hKGA L669 + sítio de <i>XhoI</i> (Reverse)	5'-TGGTGCTCGAGTTACAACAATCCATCAAGATTCTT-3'
hKGA V220Stop (Forward)	5'-AGAAGAAAGTTTGTGTAACTGACTTTATGTCT-3'
hKGA V220Stop (Reverse)	5'-AGACATAAAGTCAGGTTACACAACTTTCTTCT-3'
hKGA K550Stop (Forward)	5'-GGTGGTGATCAAAGGTAAAAGTCAGTGATAAAT-3'
hKGA K550Stop (Reverse)	5'-ATTTATCACTGACTTTTACCTTTGATCACCACC-3'

4.1.2. Plasmídeos e vetores.

pET-28a (Novagen)

pGL4.75 [hRluc/CMV] e pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro] (Promega)

pET-28a/mGAC(Δ 1-127): o cDNA de GAC de *Mus musculus* (Δ 1-127) foi clonado pelo Dr. Andre L. B. Ambrosio.

pET-28a/hPPAR γ (Δ 1-100) e pcDNA-Flag/PPAR γ -FL(full-length): gentilmente fornecidos pela Dra. Ana C. M. Figueira do LNBio.

pcDNA3.1/hKGA-V5: gentilmente cedido pelo laboratório do Dr. Richard Cerione da Universidade de Cornell (Ithaca, NY, EUA).

pGL4.27-3 \times DR1: clonado por Douglas M. Adamoski. O elemento responsivo de PPAR γ (PPRE) foi gerado pela inserção de três cópias da sequência DR1 (TTCTGACCTATGACCTGG) a montante do gene de luciferase do vetor pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro].

4.1.3. Meios de cultura.

Meio de cultura de bactéria LB:

10 g.L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl); 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 10 g.L⁻¹ de triptona.

Meio de cultura de células de mamífero:

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e Soro Fetal Bovino (Vitrocel)

RPMI-1640 (Sigma)

4.1.4. Linhagens celulares.

Cepas de *Escherichia coli*: BL21 (DE3) e Rosetta-2 (Novagen)

Linhagens celulares de mamíferos: HEK-293T (ATCC® CRL-3216™) e MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™)

4.1.5. Tampões e soluções.

Tampões para eletroforese:

Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (50X): 2 M Tris, 57% ácido acético, 50 mM EDTA (pH 8).

Tampão de corrida Tris-glicina (10X): 250 mM Tris ;1,92 M glicina; 1% SDS.

Tampão de amostra SDS-PAGE (4X): 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% SDS; 30% glicerol; 0,2% azul de bromofenol e 300 mM DTT.

Tampões de purificação de glutaminases:

- Tampão de ressuspensão: 500 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8,5; 10% glicerol; 2 mM β-mercaptoetanol e 1 mM PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto).
- Tampão de afinidade: 10 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8,5.
- Tampão A: 10 mM NaCl, Tris-HCl pH 8,5.
- Tampão B: 1 M NaCl, Tris-HCl pH 8,5.
- Tampão de gel-filtração para GAC e ΔC: 500 mM NaCl; 30 mM HEPES pH 8; 0,5 mM TCEP.
- Tampão de gel-filtração para demais construções de KGA: 150 mM NaCl; 30 mM HEPES pH 8; 0,5 mM TCEP.

Tampões de purificação das construções de PPAR γ :

- Tampão de ressuspensão: 500 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 10% glicerol; 2 mM β -mercaptoetanol (β -ME) e 1 mM PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto).
- Tampão de afinidade: 10 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5.
- Tampão A: 10 mM NaCl, Tris-HCl pH 7,5.
- Tampão B: 1 M NaCl, Tris-HCl pH 7,5.
- Tampão de gel-filtração: 150 mM NaCl; 30 mM HEPES pH 8; 0,5 mM TCEP.

4.1.6. Colunas e resinas para purificação de proteínas.

HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE)	HiTrap Q FF 5 mL (GE)
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE)	HiTrap SP HP 1 mL (GE)
Superdex 75 10/300 GL (GE)	HiTrap SP FF 5 mL (GE)
HiTrap Q HP 1 mL (GE)	TALON Metal Affinity Resin (Clontech)

4.1.7. Kits.

Kits diversos:

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	Promega
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

Kits para cristalização de proteínas:

Crystal Screen HT	Hampton Research
JCSG+ Suite	Qiagen
PACT Suite	Qiagen
Precipitant Synergy	Emerald BioSystems
SaltRx HT	Hampton Research
Wizard I&II	Emerald BioSystems

4.2. Metodologia

4.2.1. Clonagem de KGA humana.

Para a expressão heteróloga de KGA humana em sistema bacteriano, foram geradas 6 construções envolvendo diferentes combinações dos domínios da proteína (Figura 12). Utilizando oligonucleotídeos adequados (Tabela 2), os clones foram amplificados e subclonados em vetor pET-28a a partir do clone pcDNA3.1/hKGA-V5. A primeira construção gerada engloba os 3 domínios, porém com uma deleção dos primeiros 123 aminoácidos da porção N-terminal (referida como KGA Δ 1-123 ou 124-669). A região excluída envolve o sinal mitocondrial, que é processado na maturação da enzima (~70-80 aminoácidos iniciais) seguida de uma porção N-terminal possivelmente desordenada e suscetível a proteólise (Kenny et al. 2003).

Além desta subconstrução mais completa, foram clonadas regiões menores iniciando a partir do domínio catalítico (KGA Δ 1-220 ou KGA 221-669) e a partir do domínio C-terminal (KGA Δ 1-550 ou KGA 551-669). Por fim, a partir destas duas construções, foram geradas outras três utilizando a metodologia de mutagênese sítio-dirigida. Deste modo, os resíduos Ile221 e Val551 foram mutados para *stop codon* (TAA) usando o QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit para a geração das construções envolvendo apenas o domínio N-terminal (KGA 124-220), o domínio N-terminal mais o domínio catalítico (KGA 124-550) e apenas o domínio catalítico (KGA 221-550). Por fim, as sequências de cada um dos clones gerados foram confirmadas por sequenciamento.

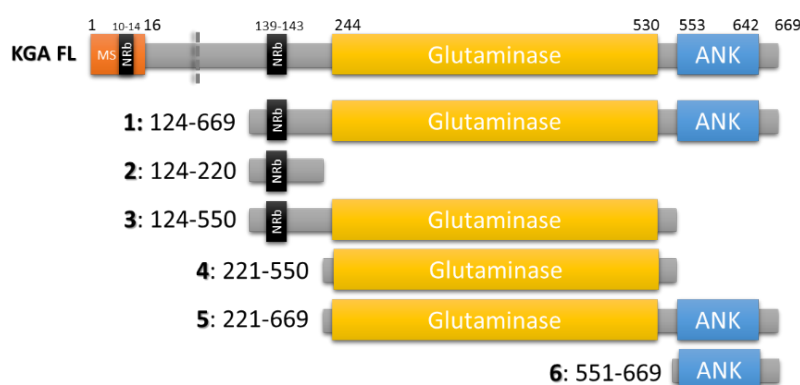


Figura 12. As seis construções de KGA humana geradas por subclonagens e mutagêneses sítio-dirigidas para inserção de *stop codons* nas posições 221 e 551. MS: *mitochondrial signaling sequence*. NRb (ou NR box): *nuclear receptor box* (motivo LXXLL, L= leucina e X = aminoácido qualquer). ANK: domínio *ANK repeat*. A linha tracejada indica a região de processamento após ímpor mitocondrial.

4.2.2. Testes de expressão.

Bactérias *E. coli*, cepa Rosetta II, foram transformadas com os vetores resultantes das clonagens descritas no item anterior através da técnica de choque térmico. Para o teste de expressão, colônias individuais resultantes de cada transformação foram cultivadas em 2 mL de LB (*Lysogeny Broth*) líquido contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cloranfenicol. As culturas foram incubadas por 3 h, 37°C a 200 rpm. Uma fração não induzida de 350 μL foi colhida e o restante da cultura foi induzida com 1 mM de IPTG. As frações induzidas (300-500 μL) foram colhidas 3 horas após a indução. Todas as frações foram centrifugadas por 2 minutos a $5.200 \times g$, 4°C e as células separadas do sobrenadante foram ressuspensas em 50 μL de tampão de amostra SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos a 95°C e submetidas a análises de migração em gel gradiente 4 a 10% de poliacrilamida (v/v) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). A visualização das bandas de proteínas foi possível após coloração com solução de Coomassie brilliant blue R.

4.2.3. Expressão em larga escala.

Pré-inóculos contendo 50 mL de meio LB com antibiótico – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina para cepas BL21; 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol e a mesma concentração de canamicina para Rosetta-2 – foram cultivados *overnight* a 37°C, em agitação de 200 rpm e usados para inocular 5 L de meio LB contendo os mesmos antibióticos, distribuídos igualmente em cinco frascos Erlenmeyer de 2 L cada. O crescimento dos inóculos foi feito a 37°C, 200 rpm até atingir A_{600} entre 0,6 e 0,8. A temperatura foi, então, reduzida para 18 (para as construções de glutaminases) ou 22°C (para as construções de PPAR γ). Apenas para a construção contendo o DBD (PPAR γ DBD-LBD), foi necessário suplementar o meio de cultura com 10 μM de sulfato de zinco, uma vez que o zinco é necessário para estabilizar o dobramento dos motivos *zinc finger* de ligação ao DNA. Após a indução com 200 ou 500 nM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), os inóculos foram cultivados *overnight* nas condições descritas. As células bacterianas foram isoladas a $10.000 \times g$ por 10 minutos, os *pellets* foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C.

4.2.4. Purificação de proteínas recombinantes.

As células de bactéria isoladas e mantidas a -80°C foram descongeladas e ressuspensas em 20 mL de tampão de ressuspensão para cada litro de expressão. Para a lise celular foram utilizados 120 mg de lisozima, 60 mg de ácido desoxicólico (DOC) e 2 mg de DNase para cada litro de expressão, seguido de incubação por 1 hora em banho de gelo. Alternativamente, foram adicionados 12 mg de lisozima e, após 30 minutos de incubação, o lisado foi submetido a 30 ciclos de sonicação de 10 segundos intercalados por intervalos de 50 segundos (amplitude de 20%) com sonicador SONICS VCX 500. A fração solúvel resultante desse processo foi separada por centrifugação a $19.400 \times g$ por 1 hora a 4°C .

O primeiro passo de purificação consistiu em cromatografia de afinidade a metais imobilizados (IMAC), utilizando resina TALON previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) de tampão de afinidade. Após a passagem do lisado, a resina foi lavada em três etapas com o tampão de afinidade acrescido de:

- Etapa 1: 2 mM β -ME (6 CV),
- Etapa 2: 2 mM β -ME e 5 mM de imidazol (3 CV)
- Etapa 3: 2 mM β -ME e 25 mM de imidazol (3 CV).

Por fim, a proteína de interesse foi eluída com 2 CV do tampão de afinidade contendo 300 mM de imidazol e 2 mM β -ME. Para a clivagem da His-tag, foi adicionado ao eluato 30 unidades de trombina para cada litro de expressão da proteína de interesse, seguido por incubação *overnight* a 4°C .

Um segundo passo de purificação envolvendo cromatografia de troca iônica foi utilizado em caso de impurezas constatadas por SDS-PAGE após a afinidade. Para tal, utilizou-se colunas HiTrap Q ou SP de 1 ou 5 mL, dependendo da quantidade de proteína purificada. Esta cromatografia líquida foi realizada em sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare), sob um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A eluição da proteína foi feita a partir de gradiente linear partindo de 10 mM (Tampão A) até 1 M de NaCl (Tampão B) em 40 CV para colunas de 1 mL ou em 20 CV para colunas de 5 mL. A maior parte das proteínas foram purificadas por troca aniônica, com exceção da construção PPAR γ DBD-LBD, pois seu ponto isoelétrico alto (pI teórico de 8,55) tornou a troca catiônica mais apropriada.

O último passo de purificação, também em FPLC, consistiu em cromatografia de gel-filtração utilizando colunas HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (ou 75 pg, dependendo do peso molecular da proteína) previamente equilibradas com tampão de gel-filtração. As concentrações das amostras de proteína purificada foram estimadas por medidas de absorbância a 280 nm, usando a Lei de Lambert-Beer e os coeficientes de extinção molar ϵ das proteínas purificadas calculados pelo servidor ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org).

4.2.5. Ensaios de atividade de glutaminase.

O ensaio de atividade de glutaminase foi realizado de acordo com protocolo estabelecido no laboratório, no qual a obtenção dos parâmetros cinéticos da atividade de glutaminase é feita através de uma medição indireta. O ensaio é acoplado à deaminação de Glu a α -KG pela enzima Glutamato Desidrogenase (GDH), que reduz neste processo uma molécula de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD^+) em NADH, composto que absorve UV a 340 nm (Figura 13). Desta forma, a velocidade de reação é medida pela formação de NADH e não de Glu, uma vez que este aminoácido não absorve luz no espectro UV visível.

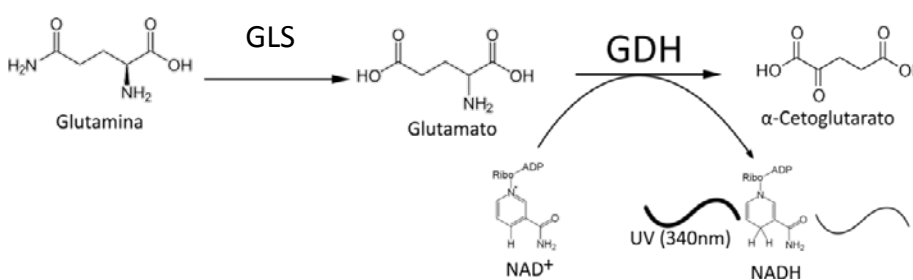


Figura 13. Esquema do ensaio cinético para medir atividade de glutaminase.

A glutaminase (GLS) converte glutamina em glutamato e este, por sua vez, é convertido em α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), de maneira dependente de NAD^+ . A velocidade de reação é medida pela formação de NADH detectada por absorvância a 340 nm.

Para obter os parâmetros cinéticos das construções recombinantes de glutaminases, um mix contendo 10 nM da enzima, 50 mM de Tris-acetato pH 8,6, 3 unidades de GDH, 2 mM de NAD e 20 mM de K_2HPO_4 (estoque a 2 M, pH 8,6) foi pipetado em placas de 96 poços contendo 6 diluições seriadas de L-glutamina em concentrações variando de 1,875 a 30 mM. O composto K_2HPO_4 serviu como fonte de P_i para a reação, responsável pela ativação da enzima. A formação de NADH foi monitorada por leituras de absorvância a 340 nm por até 5 minutos consecutivos a

temperatura ambiente (TA). Cada medida foi feita em triplicata e o volume total por reação foi de 200 μL . O leitor de placas utilizado foi um Enspire 2300 MultiLabel Reader (Perkin Elmer).

Para cada concentração de glutamina testado, as velocidades iniciais (em pmols de NADH por segundo) foram calculadas usando as inclinações das retas de absorbância em função do tempo divididas pelo coeficiente de extinção do NADH de $6.220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 340 nm multiplicado pelo caminho óptico de 0,5 cm. Estes cálculos foram feitos utilizando o programa Excel (Microsoft). Para o cálculo dos parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten, K_M e velocidade máxima, V_{max}), as velocidades iniciais plotadas em função da concentração de glutamina foram ajustadas utilizando equação de Michaelis-Menten (equação 1), usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia):

$$v = \frac{v_{\text{max}} \times [\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_M} \quad (1)$$

Onde $[\text{Gln}]$ é a concentração de substrato em mM.

Considerando que a concentração de enzima utilizada no ensaio é conhecida, optamos por ajustar os valores de K_{cat} (constante catalítica) no lugar de V_{max} :

$$v = \frac{Et \times K_{\text{cat}} \times [\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_m} \quad (2)$$

onde Et é a concentração total de enzima.

K_{cat} também é chamado de número de *turnover*, ou seja, o número de moléculas de substrato que cada sítio ativo da enzima converte em produto por unidade de tempo. Portanto, quanto maior o K_{cat} , mais favorável a reação em direção à formação de produto. Por sua vez, K_M é a constante que descreve a quantidade de substrato necessária para obter metade da velocidade máxima da reação. Por fim, a razão K_{cat}/K_M fornece uma medida de eficiência catalítica, desde que a concentração de substrato seja bem inferior ao K_M .

Para avaliar o efeito de PPAR γ na atividade de KGA, a construção *hinge-LBD* foi previamente incubada com a enzima nas proporções de 1:10 e 1:50, em molar, por uma hora a 4°C antes da realização do ensaio de atividade conforme descrito

acima, na presença de RGZ a 500 μ M final. Como RGZ está dissolvida em DMSO, foi adicionado a mesma quantidade deste composto ao controle negativo.

4.2.6. Proteólise limitada.

Para determinar a melhor condição de proteólise limitada, a construção envolvendo o C-terminal de KGA (551-669) previamente purificada foi incubada nas proporções 1:10, 1:100 e 1:1000 (w:w) com tripsina de pâncreas suíno, α -quimotripsina de pâncreas bovino e subtilisina A bacteriana por 16 horas a 23°C. Amostras foram coletadas após intervalos de tempo pré-determinados, diretamente misturadas com tampão de amostra e analisadas por SDS-PAGE.

Para a proteólise limitada em larga escala, KGA 551-669 resultante da purificação por cromatografia de gel-filtração foi incubada com tripsina 1:100 (w:w) a TA por 20 minutos. A proteólise foi interrompida pela adição de 1,5 mM de PMSF. O fragmento resultante da digestão foi imediatamente isolado por cromatografia de gel-filtração utilizando coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg.

4.2.7. Ensaios de cristalização.

Para os ensaios de cristalização, o fragmento da região C-terminal de KGA resultante de proteólise limitada foi concentrado para aproximadamente 25 mg.mL⁻¹ usando concentrador com limite de exclusão de 10 kDa (Amicon). Para o *screen* inicial de cristalização, foram testados 6 kits de cristalização contendo 72 ou 96 condições, cada. A montagem das placas foi feita de forma automatizada pelo laboratório ROBOLAB (LNBio/CNPEM, Campinas, SP) utilizando o robô HoneyBee 963 (Digilab Global) pela técnica de gota sentada. Após montadas, as placas foram inseridas no equipamento Rock Imager 1000 (Formulatrix) e incubadas em temperaturas de 4 e 18°C. As imagens das gotas de cristalização foram acessadas através do servidor *on-line* Rock Maker Web.

As condições de cristalização bem-sucedidas provenientes do *screen* inicial foram posteriormente refinadas. O refinamento foi realizado variando-se de maneira discreta em torno do valor inicial, tanto o pH (variações de 0,2 a 0,3) das

soluções quanto a concentração dos agentes precipitantes. Para cada condição refinada, foram testadas três diferentes proporções entre o volume de proteína e de solução de cristalização adicionados à gota (1:1, 2:1 e 1:2, em v/v). Os blocos de refinamento foram montados utilizando o equipamento Matrix Maker (Emerald Biosystems) e as placas de cristalização foram elaboradas pelo HoneyBee 963, a partir de amostra purificada na concentração de aproximadamente 22 mg.mL⁻¹.

A construção de KGA 124-669 foi concentrada para cerca de 11 mg.mL⁻¹ utilizando concentrador com limite de exclusão de 30 kDa. A varredura inicial de cristalização foi feita de maneira semelhante ao descrito acima. Para os ciclos posteriores de refinamento, as placas de cristalização foram preparadas manualmente por gota sentada. No último ciclo, a proteína foi concentrada para 7,5 mg.mL⁻¹ e incubada com seu inibidor BPTES a 1,2 mM (equivalente a excesso molar de 10X) uma hora antes de iniciar a montagem das placas de cristalização. Anteriormente à coleta de dados em temperatura criogênica (100 K), os cristais foram crioprotetidos com etileno glicol 10%.

4.2.8. Coleta de dados de difração de raios X.

Os cristais de proteína foram pescados utilizando *microloops* de tamanho apropriado (MiTeGen), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e enviados para a coleta de dados de raios-X. Para os cristais obtidos a partir do fragmento C-terminal de KGA, a coleta foi feita no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL, Menlo Park, CA, EUA). As amostras foram primeiramente submetidas a um processo de triagem automatizado na linha de luz 12-2 para verificar a qualidade dos cristais e selecionar aqueles que seriam posteriormente submetidos à coleta. Nesta triagem, foi feita a coleta de até três imagens de difração correspondentes a três ângulos de orientação do cristal seguida de auto-indexação automática e fornecimento de dados estatísticos iniciais, como simetria, resolução e estimativas de mosaicidade. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até a coleta de dados, que foi feita na mesma linha de luz de maneira remota em conjunto com a pesquisadora colaboradora Dr^a. Ana Gonzalez. A coleta de dados de SAD (*Single-wavelength Anomalous Dispersion*) de enxofre foi feita em um comprimento de onda mais longo ($\lambda = 1.77 \text{ \AA}$), de modo a amplificar o sinal anômalo dos átomos de enxofre.

Por sua vez, a coleta de dados dos cristais de KGA Val124-Leu669 foi realizada na linha de luz I03 do *Diamond Light Source* (Didcot, Oxford, Reino Unido), durante viagem do Dr. Artur Torres Cordeiro e o doutorando Américo Tavares Ranzani, aos quais expressamos nosso agradecimento nesta ocasião.

4.2.9. Processamento dos dados de difração de raios X.

O padrão de difração foi indexado e as intensidades das reflexões hkl nas imagens de difração foram integradas e escalonadas usando Mosflm (Leslie & Powell 2007) para conjuntos de dados nativos, ou XDS (Kabsch 2010) para conjunto de dados de SAD e escalonados com Aimless (Evans & Murshudov 2013). O primeiro conjunto de fases de KGA Val124-Leu669 foi obtido pela técnica de substituição molecular pelo programa Phaser (McCoy et al. 2007), usando as coordenadas da isoforma GAC humana ligada ao BPTES (PDB 4JKT).

A estrutura do C-terminal de KGA foi resolvida por SAD, a partir do espalhamento anômalo dos átomos de enxofre nativos (S-SAD). O conjunto de dados anômalo permitiu a identificação inequívoca e faseamento de 4 átomos de enxofre por cadeia (3 metioninas e 1 cisteína) usando SHELXC/D/E (Sheldrick 2010). Com ARP/wARP (Perrakis, Morris, & Lamzin 1999), foi possível encontrar 178 resíduos em duas cadeias dos 182 resíduos esperados e o modelo foi refinado usando os conjuntos de dados nativos de maior resolução. Os ciclos de refinamento e modelamento de solventes foram feitos com Refmac (Vagin et al. 2004), seguido por inspeção visual usando COOT (Emsley et al. 2010).

4.2.10. Análises filogenéticas.

Para a reconstrução filogenética, a sequência de aminoácidos do domínio glutaminase de GLS humano (Ile221-Arg544) foi utilizada como sujeito de busca na base de dados do GenBank (Clark et al. 2016), usando a ferramenta de buscas BLAST. As 726 sequências obtidas foram alinhadas usando kalign (Lassmann & Sonnhammer 2005). A reconstrução filogenética com base no critério de máxima verossimilhança foi feita utilizando o programa RAxML (Stamatakis 2014) com 260

pseudo-réplicas de *bootstrap* e empregando um modelo automatizado de busca. As réplicas foram sumarizadas utilizando SumTrees (*Phylogenetic Tree Summarization and Annotation*), ferramenta de DendroPy (Sukumaran & Holder 2010). Alinhamento e árvore serão depositadas no banco de dados TreeBase (<https://treebase.org>). A árvore filogenética e o respectivo alinhamento foram usados para reconstruir estados ancestrais para nodos específicos usando máxima parcimônia, conforme implementado no phangorn (Schliep 2011). Os *heatmaps* das distâncias par a par foram construídos em SDT (Muhire, Varsani, & Martin 2014) usando alinhamento MUSCLE (Edgar 2004).

Para analisar a evolução da estrutura de éxons dos genes de glutaminases, a sequência proteica correspondente ao éxon 14 de GLS humano foi usado como sujeito de busca no tblastn (*translated* BLAST) contra os genomas disponíveis de *Ciona intestinalis* (Dehal 2002), *Branchiostoma floridae* (Putnam et al. 2008), *Petromyzon marinus* (Smith et al. 2013), *Callorhinchus milii* (Venkatesh et al. 2014), *Danio rerio* (Howe et al. 2013) e *Xenopus tropicalis* (Hellsten et al. 2010). Após encontrar o melhor *hit* recíproco (*Reciprocal Best Hit*, Tatusov, Koonin, and Lipman 1997) inicial, a posição correta do éxon foi determinada por alinhamento LALIGN par a par entre sequências (Huang & Miller 1991). A região a jusante da sequência genômica homóloga ao éxon 14 também foi avaliada por LALIGN contra o éxon exclusivo de GAC humana (éxon 15). Como ambas sequências de glutaminases pertencentes a *Petromyzon marinus* estão incompletas, os éxons disponíveis foram encontrados em contig usando abordagem LALIGN. A região de GLS compreendendo íntron 14, éxon 15 e íntron 15 foram usados como sujeitos na busca por retrotransposons usando TranspoGene (Levy, Sela, & Ast 2008).

Todas as análises filogenéticas apresentadas neste trabalho foram feitas em colaboração com Douglas Adamoski.

4.2.11. Ensaios de Anisotropia de fluorescência.

As glutaminases expressas de forma recombinante e purificadas foram marcadas com FITC. Para tal, 1 mg de proteína a 1 mg.mL⁻¹ foi diluída em 1 mL de solução de tetraborato de sódio (N₂B₄O₇·10H₂O, estoque a 50 mM) e incubada na

presença do fluoróforo em excesso molar de 20X por 1 hora. O excesso de sonda livre foi removido por cromatografia de gel-filtração em coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg. A proteína foi quantificada por absorbância a 280 nm. Entretanto, como o fluoróforo também absorve a 280 nm, um fator de correção (CF) foi usado para descontar a contribuição dele na absorbância a 280 nm (equação 3).

$$\text{Concentração da proteína (M)} = \frac{A_{280} - (A_{\max} \times \text{CF})}{\epsilon} \times \text{fator diluição} \quad (3)$$

onde, A_{\max} = absorbância (A) de uma solução de fluoróforo medida no comprimento de onda em que ocorre a sua máxima absorção (λ_{\max}). Para FITC, λ_{\max} = 494 nm e $\text{CF}_{\text{FITC}} = 0,3$; ϵ = coeficiente de extinção molar da proteína.

Para o cálculo da taxa de incorporação da sonda na proteína, foi empregada a equação 4.

$$\text{Mols de FITC por mols de proteína} = \frac{A_{\max} \text{ da proteína marcada}}{\epsilon' \times \text{concentração da proteína (M)}} \times \text{fator de diluição} \quad (4)$$

onde, ϵ' = coeficiente de extinção molar do fluoróforo, sendo que $\epsilon_{\text{FITC}} = 68.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Após a marcação, as proteínas foram aliquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o momento da realização do ensaio de anisotropia.

O ensaio de anisotropia se baseia no princípio de que moléculas menores (neste experimento, caracterizadas pelas glutaminases marcadas com FITC livres em solução), causam maior despolarização da luz em comparação com moléculas maiores (neste experimento, formadas pelo complexo de glutaminases-FITC com PPAR γ), devido ao seu movimento browniano mais acelerado (Figura 14). Assim sendo, as medidas de polarização da luz determinam o deslocamento angular médio que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão do fóton pelo fluoróforo. Tal deslocamento angular depende da taxa de difusão rotacional que ocorre durante a vida média do estado excitado do fluoróforo e pode ser descrito em função da anisotropia (r):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (5)$$

onde I_{\parallel} corresponde à intensidade observada quando o polarizador de emissão está orientado paralelamente (\parallel) à excitação polarizada; I_{\perp} corresponde à intensidade observada quando o polarizador está perpendicular (\perp) à excitação. A anisotropia é uma medida adimensional que é independente da intensidade total da amostra. Isto ocorre porque a diferença ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) é normalizada pela intensidade total, $I_T = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$.

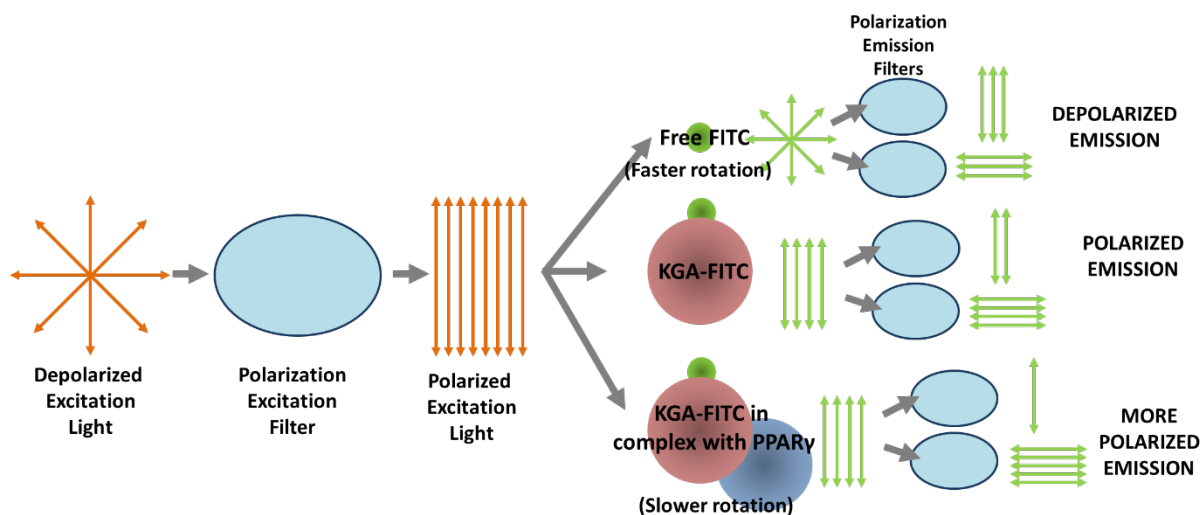


Figura 14. Diagrama esquemático do ensaio de anisotropia de fluorescência, envolvendo glutaminases (KGA e GAC) marcadas com o fluoróforo FITC para caracterização de sua interação com PPAR γ . Após excitação com luz polarizada, as moléculas de KGA-FITC em complexo com PPAR γ sofrem difusão rotacional mais lenta do que as moléculas de KGA-FITC livres em solução, resultando em maior polarização da luz emitida. A anisotropia é calculada a partir das intensidades polarizadas vertical e horizontal medidas pelo equipamento.

Para a realização dos ensaios de anisotropia, as glutaminases marcadas com FITC foram tituladas com PPAR γ obtido de forma recombinante. Para a titulação, as construções de PPAR γ DBD-LBD e *hinge*-LBD foram purificadas, concentradas acima de 250 μ M e diluídas de forma seriada, num total de 14 diluições. A cada diluição, adicionamos glutaminase marcada com FITC na concentração final de 5 nM, e, por fim, transferimos o volume final para uma microplaca preta de 384 poços (Greiner Bio-One) em replicatas de 25 μ L cada. A incubação foi feita na ausência de luz, a TA.

Os ensaios foram feitos também na presença de P_i (20 mM) e dos ligantes de PPAR γ RGZ e GW-9662, ambos a 500 μ M final, para observar possíveis efeitos na afinidade de interação entre glutaminases e PPAR γ . Como RGZ e GW-9662 estão dissolvidos em DMSO, este foi adicionado às amostras controles correspondentes à ausência de ligantes.

A leituras foram realizadas após 24 horas de incubação no equipamento CLARIOstar (BMG Labtech), com excitação e emissão nos respectivos comprimentos de onda de 480 nm e 535 nm, utilizando-se 2 filtros de polarização ortogonais. Os dados foram analisados usando o software OriginPro 9 (OriginLab).

Os valores de K_d foram estimados utilizando-se os valores de anisotropia calculados pelo próprio equipamento *versus* a concentração de PPAR γ (em escala logarítmica de base 10), e os parâmetros da curva foram obtidos através de um modelo sigmoidal logístico descrito pela equação:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (6)$$

onde A_1 e A_2 são, respectivamente, as assíntotas horizontais esquerda e direita. O ponto de inflexão das curvas é x_0 , matematicamente interpretado como o valor de K_d . O valor p simboliza o coeficiente de Hill.

4.2.12. Ensaio de gene repórter de luciferase.

O ensaio de gene repórter de luciferase foi utilizado para avaliar o efeito de KGA na atividade transcricional de PPAR γ . Para tanto, empregamos o sistema Dual-Luciferase Reporter (DRL), que utiliza a luciferase de vagalume como gene repórter experimental, enquanto a luciferase de *Renilla* é empregada como controle interno para a normalização dos valores de luminescência.

Os seguintes vetores da série pGL4, desenhados para serem utilizados no sistema DLR, foram empregados, respectivamente, para a co-transfecção dos genes de luciferase de vagalume e de *Renilla*: pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro] e pGL4.75 [hRluc/CMV]. O elemento responsivo de PPAR γ (PPRE) foi gerado pela inserção prévia de três cópias da sequência DR1 (TTCTGACCTATGACCTGG) a montante do gene de luciferase do vetor pGL4.27, de modo que sua expressão estivesse sob controle direto da atividade de PPAR γ sobre o elemento responsivo. Deste modo, o objetivo deste ensaio foi medir a atividade de transativação de PPAR γ sobre o gene de luciferase de vagalume, tanto na ausência quanto na presença de KGA. Os níveis de expressão de luciferase, proteína monomérica de 61 kDa, foram detectados a partir

de sua atividade enzimática. Basicamente, adiciona-se o substrato de luciferase, a luciferina de vagalume, ao lisado celular e faz-se a leitura imediata do “flash” de luz produzido (Figura 15).

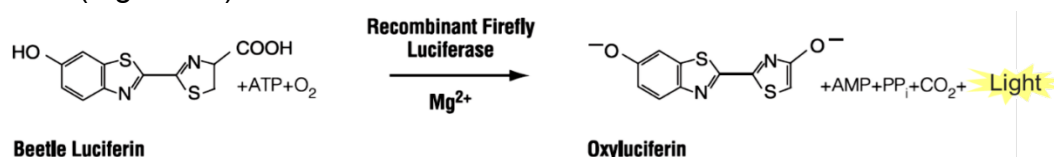


Figura 15. Reação de bioluminescência catalisada pela luciferase de vagalume. Adaptada do protocolo do sistema DRL (Promega) (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf>).

Para a realização deste ensaio, células HEK-293T (passagem #22) foram semeadas em placa de 24 poços (10⁵ células/poço) e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram co-transfectadas com os vetores pGL4.27-3×DR1, pGL4.75, pcDNA3.1 PPAR_γ (ou apenas pcDNA vazio, *mock*) e pcDNA3.1 KGA-V5 ou pcDNA vazio. Células “*mock*” foram geradas para aferir a quantidade de sinal *background* contribuído por outros fatores que possam causar ativação do gene repórter de luciferase, como a presença de PPAR_γ endógeno, sendo transfectados somente os vetores de luciferase de Vagalume e Renilla, além de um vetor vazio em substituição aos plasmídeos de expressão de KGA e PPAR_γ. As quantidades de cada plasmídeo transfectado para cada uma das condições testadas estão na tabela 3. Conforme descrito no manual do kit DRL da Promega, é aconselhável utilizar concentrações bem menores do vetor co-repórter (pGL4.75) em relação ao vetor experimental, obedecendo razões entre 1:10 a 1:50, para evitar ocorrência de efeitos *trans* entre elementos promotores (Farr & Roman 1992). Portanto, neste e nos demais ensaios de gene repórter aqui descritos, a quantidade de pGL4.75 adicionada foi sempre 40 vezes menor em relação ao pGL4.27-3×DR1. Cada condição de transfecção (*mock*, PPAR_γ e PPAR_γ+KGA) foi realizada em seis replicatas.

Tabela 3. Quantidade total de cada plasmídeo transfectados (em ng) em HEK-293T para cada replicata de cada uma das condições testadas no primeiro ensaio de gene repórter de luciferase.

Plasmídeo:	Condição		
	<i>Mock</i>	PPAR _γ	PPAR _γ + KGA
pGL4.27-3×DR1	200 ng	200 ng	200 ng
pGL4.75	5 ng	5 ng	5 ng
pcDNA3.1 PPAR _γ	-	200 ng	200 ng
pcDNA3.1 KGA-V5	-	-	200 ng
pcDNA vazio	400 ng	200 ng	-
Total	605 ng	605 ng	605 ng

O agente de transfecção empregado foi o polímero catiônico PEI na proporção 3:1 em relação à quantidade total de DNA, ou seja, 1,8 µg de PEI para 0,6 µg de DNA por poço (replicata). PEI condensa o DNA em partículas positivamente carregadas que se ligam às superfícies aniônicas das células. Consequentemente, o complexo DNA:PEI é incorporado por endocitose e o DNA é liberado dentro do citoplasma (Boussif et al. 1995; Sonawane, Szoka, & Verkman 2003).

Cerca de 12 horas após a transfecção, o meio contendo PEI foi substituído por meio contendo os tratamentos. Metade das replicatas de transfecção (n = 3) foram tratadas com 1 µM de RGZ (estoque a 28 mM) e a outra metade recebeu somente DMSO. Após 24 horas, as células foram lisadas e submetidas às leituras de luminescência (em unidades relativas de luz – RLU) no equipamento Enspire 2300 MultiLabel Reader (Perkin Elmer) seguindo as instruções do manual DLR.

Após este ensaio inicial em placas de 24 poços, os demais ensaios foram escalonados para placas de 96 poços, de modo a racionalizar a quantidade de reagentes utilizados. Deste modo, foi feito um segundo ensaio com HEK-293T (passagem #20) utilizando, neste caso, o método de transfecção reversa: o DNA (105 ng) previamente incubado com PEI (315 ng) foi adicionado aos poços da placa e as células foram posteriormente semeadas sobre o DNA (17.000 células/poço) (Tabela 4). Cerca de 12 horas após a transfecção, o meio foi substituído pelos tratamentos (1 µM RGZ/DMSO) e as células foram cultivadas por 24 horas até a realização das leituras de luminescência.

Tabela 4. Quantidade total de cada plasmídeo transfectado (em ng) em HEK-293T para cada condição testada no segundo ensaio de gene repórter de luciferase.

Plasmídeo:	Condição			
	<i>Mock</i>	PPAR γ	PPAR γ + KGA	KGA
pGL4.27-3xDR1	35 ng	35 ng	35 ng	35 ng
pGL4.75	0,87 ng	0,87 ng	0,87 ng	0,87 ng
pcDNA3.1 PPAR γ	-	35 ng	35 ng	-
pcDNA3.1 KGA-V5	-	-	35 ng	35 ng
pcDNA vazio	70 ng	35 ng	-	35 ng
Total	105,87 ng	105,87 ng	105,87 ng	105,87 ng

Um terceiro ensaio de luciferase foi realizado utilizando a linhagem de tumor de mama MDA-MB-436 (passagem #51). A escolha desta linhagem se baseou em dois critérios: (a) alta eficiência de transfecção, quando comparada com outras linhagens de tumor e (b) alta expressão de PPAR γ endógeno, indicativo de sua relevância para o metabolismo celular. Considerando a baixa aderência destas células à placa

resultante da ação citotóxica do agente PEI, o protocolo de transfecção foi otimizado de modo a evitar perda de células na troca do meio. Assim, as células foram transfectadas de maneira reversa em placa de 6 poços (5×10^5 células/poço) (Tabela 5). Após 12 horas, o meio de cada poço foi recolhido e separadamente reservado em tubo Falcon. As células foram rapidamente tripsinizadas, transferidas para o mesmo tubo e peletadas a $3.000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Para cada condição, foram feitas duas alíquotas: uma delas recebeu tratamento com RGZ e a outra, DMSO. Cada alíquota foi transferida para uma placa de 96 poços em triplicatas e as células foram cultivadas por 24 horas, horas até a realização das leituras de luminescência.

Tabela 5. Quantidade total de cada plasmídeo transfectados (em ng) em MDA-MB-436 para cada condição testada no segundo ensaio de gene repórter de luciferase.

Plasmídeo:	Condição			
	<i>Mock</i>	PPAR γ	PPAR γ + KGA	KGA
pGL4.27-3 \times DR1	2 μ g	2 μ g	2 μ g	2 μ g
pGL4.75	0,05 μ g	0,05 μ g	0,05 μ g	0,05 μ g
pcDNA3.1 PPAR γ	-	2 μ g	2 μ g	-
pcDNA3.1 KGA-V5	-	-	2 μ g	2 μ g
pcDNA vazio	2 μ g	2 μ g	-	2 μ g
Total	4,05 μ g	4,05 μ g	4,05 μ g	4,05 μ g

As medidas de luminescência resultante da atividade de luciferase de vagalume ($n = 3$) foram normalizadas em relação à luminescência de luciferase de *Renilla* (controle interno). As médias e desvios padrão (média \pm SD) foram representados em gráficos de barras, utilizando o programa GraphPad Prism 5. As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t-*Student* (não pareado) e valores P bicaudais menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos, sendo indicados por asteriscos:

(*) para valores P menores do que 0,05 ($p < 0,05$)

(**) para valores P menores do que 0,01 ($p < 0,01$)

(***) para valores P menores do que 0,001 ($p < 0,001$)

Dados sem asteriscos sugerem valores P maiores do que 0,05 e, portanto, sem diferenças estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS

5.1. Testes de expressão das construções de KGA.

As construções de KGA humana foram clonadas em pET-28a e bactérias *E. coli*, cepa Rosetta-II foram transformadas com os plasmídeos resultantes. A expressão de cada uma das construções foi testada em pequena escala (Figura 16).

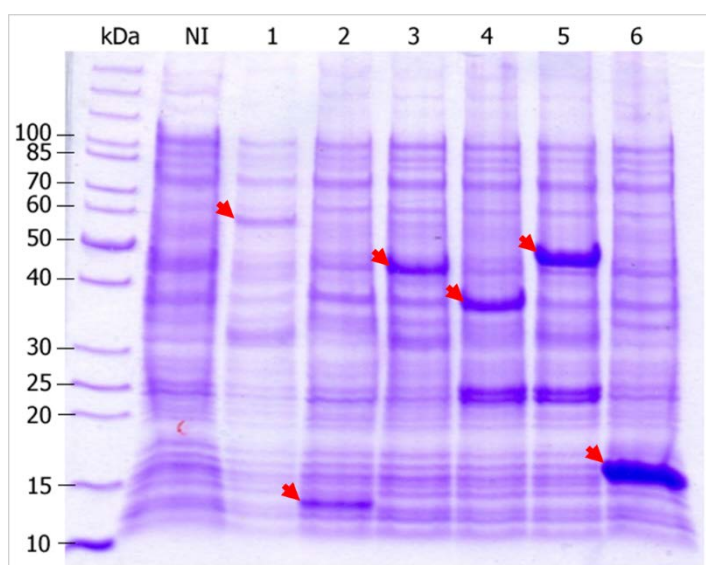


Figura 16. Teste de expressão das subconstruções de KGA humana. Bactérias *E. coli*, cepa Rosetta II, foram transformadas com os plasmídeos resultantes das clonagens em pET-28a. Colônias individuais foram cultivadas em meio LB por 3 h a 37°C. Após coleta da fração não induzida (NI), o restante da cultura foi induzido com 1 mM de IPTG. As frações induzidas foram obtidas 3 horas após a indução, centrifugadas e ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE. As frações induzidas de cada construção foram resolvidas por SDS-PAGE e o gel foi corado com Coomassie brilliant blue. NI: fração coletada antes da indução por IPTG; 1: 124-669; 2: 124-220; 3: 124-550; 4: 221-550; 221-669; 6: 551-669.

5.2. Expressão em larga escala e purificação de proteínas recombinantes.

5.2.1. Construções de glutaminases.

5.2.1.1. KGA 124-669.

A construção mais completa de KGA humana, compreendendo os três domínios da proteína, N-terminal, domínio glutaminase e C-terminal, referida como KGA 124-669 ou $\Delta 1$ -123, foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, cepa Rosetta-II, e purificada conforme representado na Figura 17.

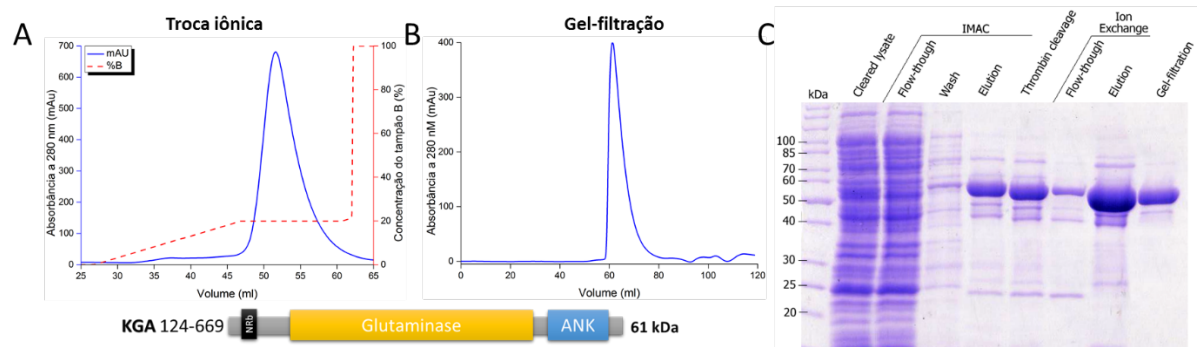


Figura 17. Purificação de KGA 124-669 expressa de forma recombinante em *E. coli*. **(A)** Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca aniônica, sendo eluída com aproximadamente 200 mM de NaCl (~20% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. **(B)** Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, realizada a partir do *pool* de frações provenientes da troca iônica contendo a proteína de interesse. **(C)** Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação de KGA. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “Cleared lysate”: lisado clarificado das células de bactéria, após centrifugação; “Flow-through”: fração do lisado celular que não interagiu com a resina de IMAC; “Wash”: lavagem da resina; “Elution”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Thrombin cleavage”: eluato proveniente da IMAC após incubação com trombina para clivagem da His-tag; “Flow-through”: fração da amostra proveniente da purificação por IMAC que não interagiu com a coluna de troca iônica (“Ion Exchange”); “Elution”: *pool* das frações referentes ao pico de KGA obtido por cromatografia de troca iônica; “Gel-filtration”: *pool* das frações referentes ao pico de KGA obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.2.1.2. KGA 124-550.

A construção de KGA humana compreendendo os domínios N-terminal e glutaminase, referida como KGA 124-550 ou ΔC , foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, cepa Rosetta-II, e purificada conforme representado na Figura 18.

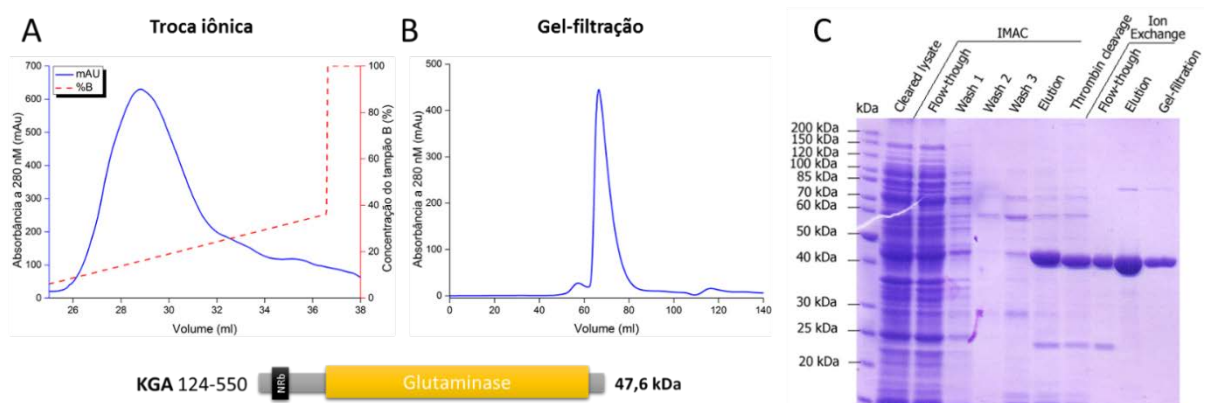


Figura 18. Purificação de KGA 124-550 (ΔC) expressa de forma recombinante em *E. coli*. **(A)** Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca aniônica, sendo eluída com aproximadamente 200 mM de NaCl (~20% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. **(B)** Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, realizada a partir do *pool* de frações provenientes da troca iônica contendo a proteína de interesse. **(C)** Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação da proteína. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “Cleared lysate”: lisado clarificado das células de bactéria, após centrifugação; “Flow-through”: fração do lisado celular que não interagiu com a resina de IMAC; “Wash 1”, “Wash 2”,

“Wash 3”: etapas de lavagem da resina de IMAC; “Elution”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Thrombin cleavage”: eluato proveniente da IMAC após incubação com trombina para clivagem da His-tag; “Flow-through”: fração da amostra proveniente da purificação por IMAC que não interagiu com a coluna de troca iônica (“Ion Exchange”); “Elution”: pool das frações referentes ao pico de KGA Δ C obtido por cromatografia de troca iônica; “Gel-filtration”: pool das frações referentes ao pico de KGA Δ C obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.2.1.3. KGA 551-669.

A construção de KGA humana compreendendo o domínio C-terminal, referida como KGA 551-669, foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, cepa Rosetta-II, e purificada conforme representado na Figura 19. Para a proteólise limitada, a amostra obtida após troca iônica foi incubada com tripsina e então injetada na coluna de cromatografia de gel-filtração.

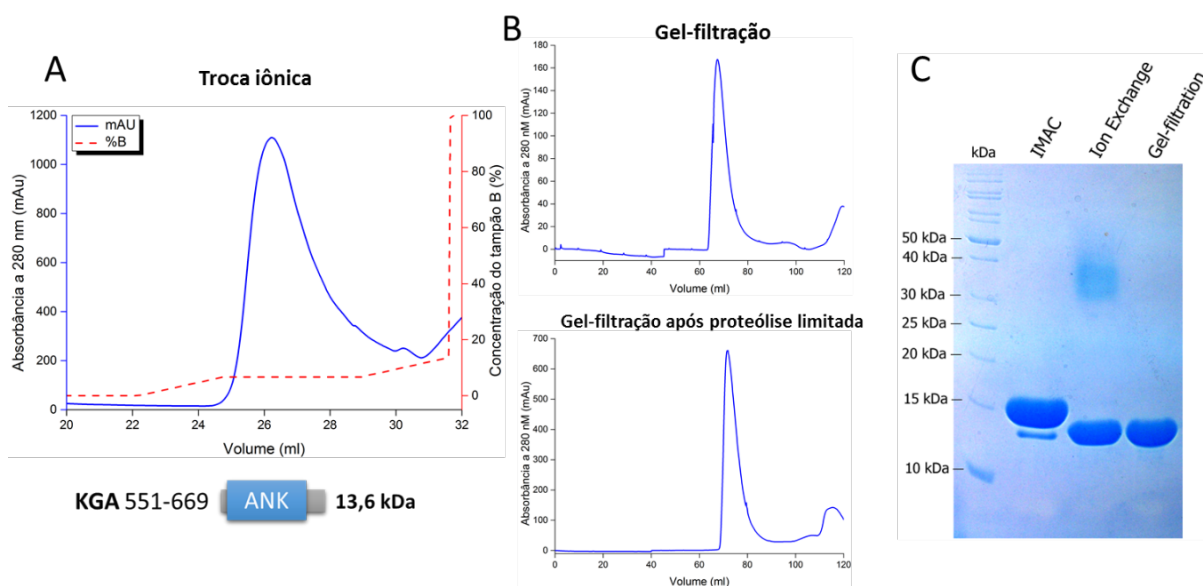


Figura 19. Purificação de KGA 551-669 expressa de forma recombinante em *E. coli*. (A) Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca aniônica, sendo eluída com aproximadamente 60 mM de NaCl (~6% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. (B) Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, antes e após a proteólise limitada com tripsina. (C) Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação da proteína. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “IMAC”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Ion Exchange”: pool das frações referentes ao pico de KGA obtido por cromatografia de troca iônica; “Gel-filtration”: pool das frações referentes ao pico de KGA obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.2.1.4. mGAC (Δ 1-127).

A construção de GAC de camundongo compreendendo os domínios N-terminal, glutaminase e C-terminal, referida como mGAC (Δ 1-127), foi expressa de

forma recombinante em *E. coli*, cepa Rosetta-II, e purificada conforme representado na Figura 20.

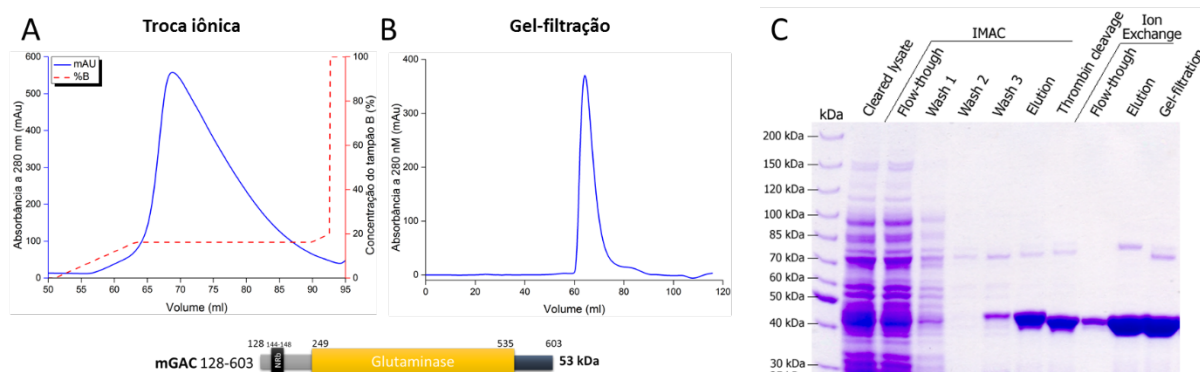


Figura 20. Purificação de mGAC (Δ 1-127) expressa de forma recombinante em *E. coli*. **(A)** Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca aniônica, sendo eluída com aproximadamente 200 mM de NaCl (~20% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. **(B)** Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, realizada a partir do *pool* de frações provenientes da troca iônica contendo a proteína de interesse. **(C)** Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação da proteína. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “Cleared lysate”: lisado clarificado das células de bactéria, após centrifugação; “Flow-through”: fração do lisado celular que não interagiu com a resina de IMAC; “Wash 1”, “Wash 2” e “Wash 3”: etapas de lavagem da resina de IMAC; “Elution”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Thrombin cleavage”: eluato proveniente da IMAC após incubação com trombina para clivagem da His-tag; “Flow-through”: fração da amostra proveniente da purificação por IMAC que não interagiu com a coluna de troca iônica (“Ion Exchange”); “Elution”: *pool* das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de troca iônica; “Gel-filtration”: *pool* das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.2.2. Construções de PPAR γ .

5.2.2.1. DBD-LBD.

A construção mais completa de PPAR γ (isoforma 1), compreendendo os dois domínios da proteína, DBD e LBD, referida como PPAR γ DBD-LBD ou Δ 1-110, foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, cepa Rosetta-II, e purificada conforme representado na Figura 21.

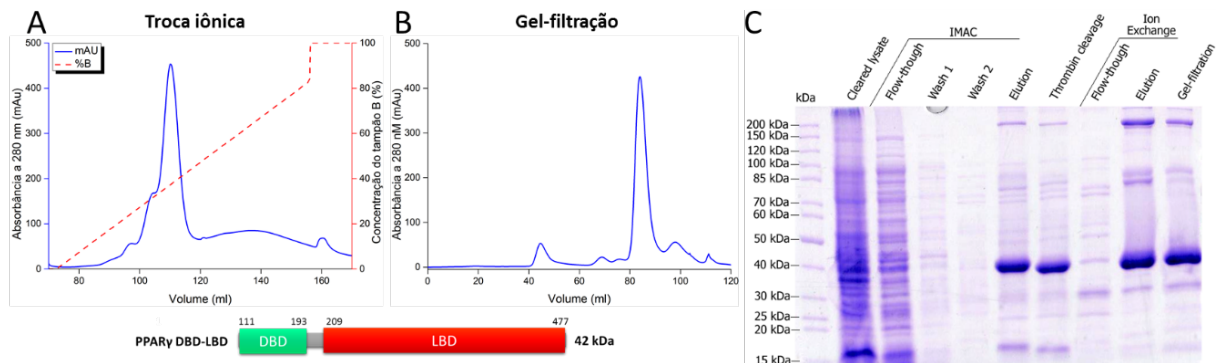


Figura 21. Purificação de PPAR γ DBD-LBD expressa de forma recombinante em *E. coli*. **(A)** Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca catiônica, sendo eluída com aproximadamente 400 mM de NaCl (~40% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. **(B)** Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, realizada a partir do *pool* de frações provenientes da troca iônica contendo a proteína de interesse. **(C)** Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação da proteína. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “Cleared lysate”: lisado clarificado das células de bactéria, após centrifugação; “Flow-through”: fração do lisado celular que não interagiu com a resina de IMAC; “Wash 1”, “Wash 2” e “Wash 3”: etapas de lavagem da resina de IMAC; “Elution”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Thrombin cleavage”: eluato proveniente da IMAC após incubação com trombina para clivagem da His-tag; “Flow-through”: fração da amostra proveniente da purificação por IMAC que não interagiu com a coluna de troca iônica (“Ion Exchange”); “Elution”: *pool* das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de troca iônica; “Gel-filtration”: *pool* das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.2.2.2. HLBD.

A construção de PPAR γ (isoforma 1), compreendendo a região *hinge* e o LBD, referida como PPAR γ *hinge*-LBD ou HLBD, foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, cepa BL21, e purificada conforme representado na Figura 22.

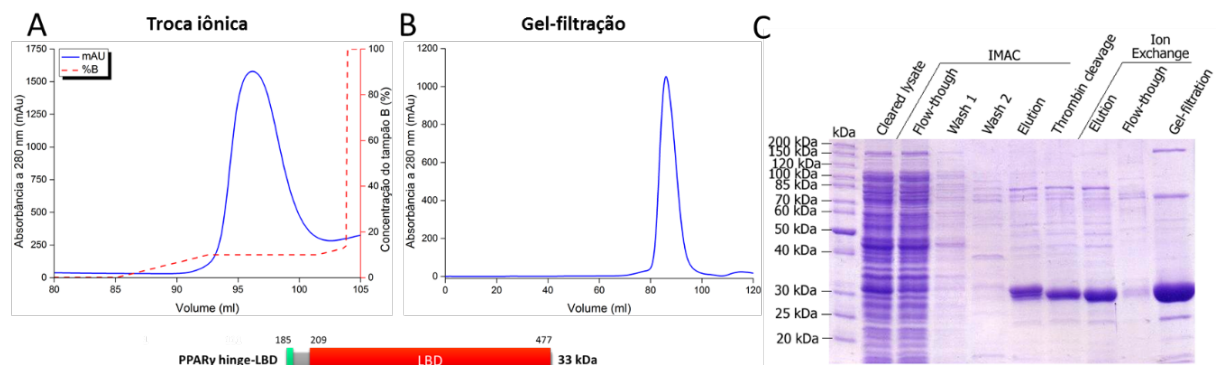


Figura 22. Purificação de PPAR γ HLBD expressa de forma recombinante em *E. coli*. **(A)** Após a cromatografia de afinidade (IMAC), a proteína foi injetada na coluna de troca aniônica, sendo eluída com aproximadamente 100 mM de NaCl (~10% B), conforme observado no cromatograma de troca iônica. **(B)** Cromatograma resultante da cromatografia de gel-filtração, realizada a partir do *pool* de frações provenientes da troca iônica contendo a proteína de interesse. **(C)** Gel de SDS-PAGE dos diferentes passos do processo de purificação da proteína. Da esquerda para a direita, “kDa”: marcador de peso molecular; “Cleared lysate”: lisado clarificado das células de bactéria, após centrifugação; “Flow-through”: fração do lisado celular que não interagiu com a resina de IMAC; “Wash 1”, “Wash 2” e

“Wash 3”: etapas de lavagem da resina de IMAC; “Elution”: eluato obtido da coluna de IMAC; “Thrombin cleavage”: eluato proveniente da IMAC após incubação com trombina para clivagem da His-tag; “Elution”: pool das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de troca iônica (“Ion Exchange”); “Flow-through”: fração da amostra proveniente da purificação por IMAC que não interagiu com a coluna de troca iônica; “Gel-filtration”: pool das frações referentes ao pico de GAC obtido por cromatografia de gel-filtração.

5.3. Estudos estruturais de KGA.

5.3.1. Determinação da estrutura cristalográfica da região C-terminal de KGA.

As tentativas iniciais de cristalização da região C-terminal de KGA (551-669) não foram bem-sucedidas. Para uma primeira prospecção de condições de cristalização, a construção C-terminal de KGA (551-669) foi purificada e concentrada até 56 mg.mL⁻¹. Após testar cerca de 1000 condições, envolvendo duas temperaturas diferentes (4 e 18°C) e 6 kits de cristalização de 72 ou 96 condições, a maioria das gotas resultaram em formação de precipitados, com a presença de algumas gotas claras e ausência total de estruturas cristalinas (Figura 23).

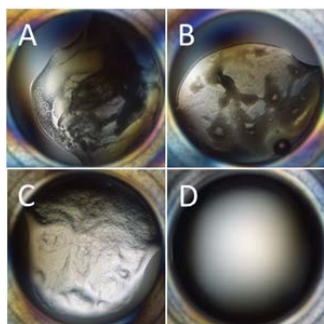


Figura 23. Resultado obtido no primeiro *screen* de cristalização de KGA C-terminal. A maior parte das gotas apresentaram precipitado amorfo e escuro (**A** e **B**), havendo também a formação de película (**C**), além da presença de gotas claras (**D**).

Assim, a estratégia de proteólise limitada foi empregada com o objetivo de remover regiões intrinsecamente flexíveis que pudessem estar impedindo a cristalização (Fontana et al. 2004). Com o intuito de identificar as condições ideais para a proteólise limitada da proteína de interesse, foram testadas três diferentes razões de protease:proteína (1:10, 1:100 e 1:1.000, em mg.mL⁻¹) e três proteases distintas: tripsina, quimotripsina e subtilisina.

A enzima subtilisina promoveu a degradação completa da proteína na diluição 1:10 logo nos primeiros 30 minutos de incubação, conforme indicado pela

ausência total de bandas no gel (Figura 24). Mesmo nas diluições 1:100 e 1:1.000, as bandas de aspecto borrado indicam provável degradação inespecífica. Por sua vez, a quimotripsina a 1:10 também degradou a proteína totalmente já nos primeiros minutos e a clivou parcialmente na diluição 1:100, indicado pela presença de duas bandas bem definidas após 30 minutos: a banda de maior e a de menor peso molecular correspondem respectivamente a proteína não clivada e clivada. A 1:1.000, a clivagem por quimotripsina ocorreu mais lentamente: a banda de proteína não clivada permaneceu mais intensa nas primeiras três horas, igualando-se em intensidade com a banda de proteína clivada somente após 16 horas. Por fim, a tripsina a 1:10 promoveu a clivagem completa da proteína, com o desaparecimento da banda superior e o surgimento de duas bandas inferiores após 30 minutos, cujas intensidades diminuíram ao longo do tempo de incubação até a degradação completa da proteína após 2 horas. A tripsina na diluição 1:100 também promoveu clivagem completa, com o aparecimento de uma banda única de menor peso molecular com 1 hora de incubação, cuja intensidade reduziu-se ao longo do tempo, estando ausente após 16 horas. Já, na diluição 1:1.000, houve clivagem somente 2 horas após o início da incubação, com o aparecimento de uma segunda banda em torno de 10 kDa.

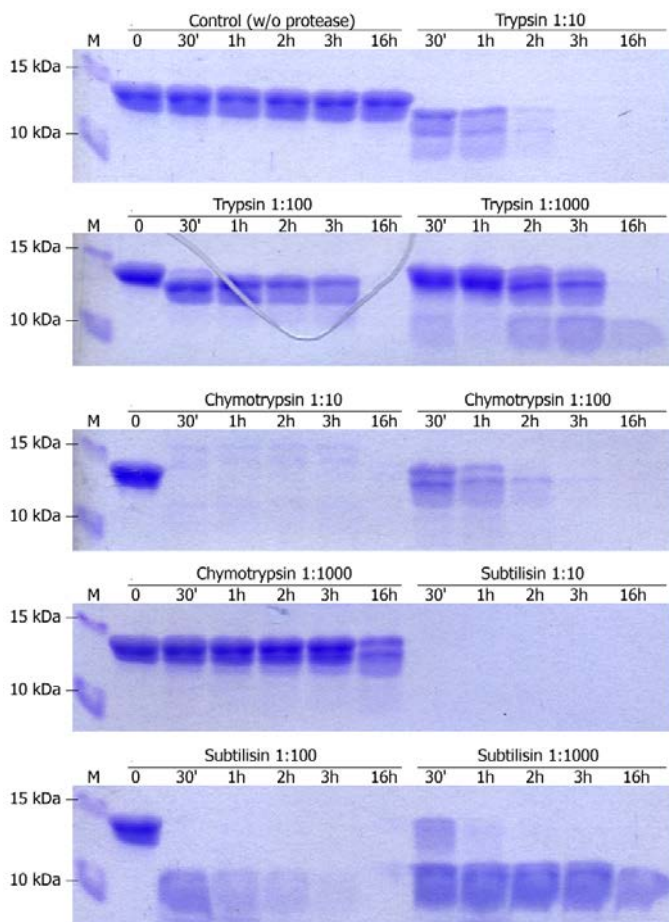


Figura 24. Teste para identificação da protease ideal, dentre tripsina, quimotripsina e subtilisina, para a proteólise limitada de KGA C-terminal. Foram testadas três diferentes razões de protease:proteína (1:10, 1:100 e 1:1.000, em mg.mL^{-1}). O tempo de incubação foi de 16 horas a TA, sendo coletadas alíquotas após 30 minutos, 1, 2, 3 e 16 horas para análise por SDS-PAGE seguido de coloração com solução de Coomassie Brilliant Blue. Um controle sem adição de protease foi realizado para verificar a estabilidade da proteína durante o tempo de incubação.

Com base neste teste, elegemos a tripsina na proporção 1:100 como a melhor enzima para a proteólise limitada de KGA C-terminal. Após adição da enzima, incubamos por cerca de 20-30 minutos, para evitar perda de proteína por degradação ao longo do tempo e, ao mesmo tempo, promover a clivagem específica e completa, representada pela banda única e bem definida de aproximadamente 12,5 kDa. Após o tempo de incubação, a tripsina foi inibida pela adição de PMSF a 1,5 mM final. A amostra foi imediatamente injetada em coluna de gel filtração (HiLoad Superdex 16/60 75 μg) para o isolamento da fração clivada (Figura 25).

Tabela 6. Condições de cristalização do screen inicial de KGA C-terminal resultante de proteólise limitada.

Kit	Número da condição no kit	Temperatura	Composição química	Figura
SaltRx HT (Hampton Research)	7	18°C	Cloreto de amônio 3,5 M; BIS-TRIS Propano 0,1 M pH 7	25.A
SaltRx HT (Hampton Research)	14	4°C	Cloreto de sódio 3,2 M; Tris 0,1 M pH 8,5	25.B
Crystal Screen HT (Hampton Research)	31	18°C	Sulfato de amônio 0,2 M; polietilenoglicol 40000 30% (m/v)	25.C
Crystal Screen HT (Hampton Research)	71	18°C	Sulfato de amônio 1,6 M; MES mono-hidratado 0,1 M pH 6,5; 1,4-dioxano 10% (v/v)	25.D
Precipitant Synergy (Emerald BioSystems)	56	4°C	Polietilenoglicol 4000 1% (m/v); tri-amônio citrato/ ácido cítrico 1 M pH 5,5	25.E
Crystal Screen HT (Hampton Research)	84	18°C	Cloreto de sódio 4,3 M; HEPES 0,1 M pH 7,5	25.F

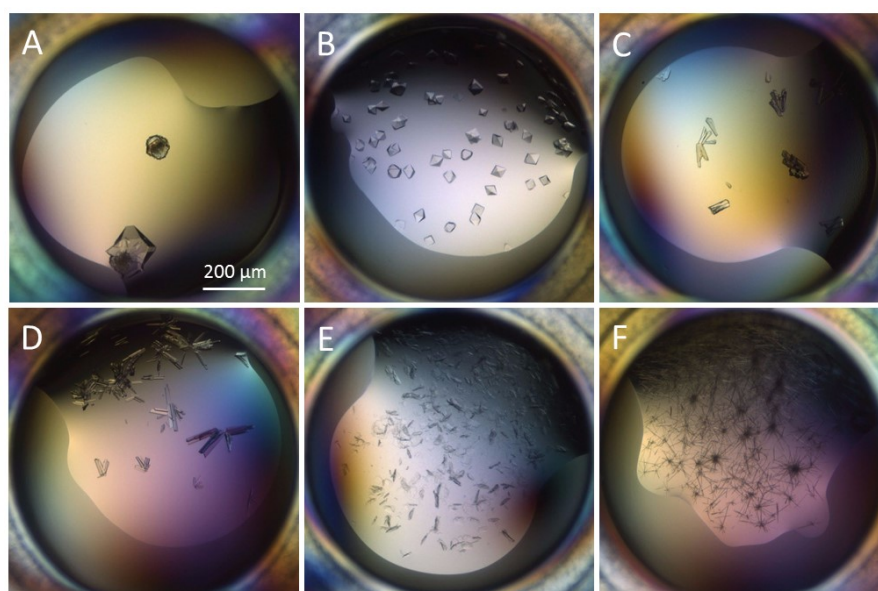


Figura 26. Screen inicial de cristalização de KGA C-terminal resultante de proteólise limitada. Foram obtidas diversas estruturas cristalinas, como cristais tridimensionais (A e B), bi-dimensionais (“placas”, C, D e E) e uni-dimensionais (“agulhas”, F).

As seis condições de cristalização representadas na figura 26, juntamente com outras seis não representadas, provenientes da mesma varredura inicial, foram posteriormente refinadas. O refinamento foi realizado variando-se de maneira discreta em torno do valor inicial, tanto o pH (de 0,2 a 0,3) das soluções quanto concentração dos agentes precipitantes. Alguns dos cristais resultantes deste refinamento estão representados na figura 27.

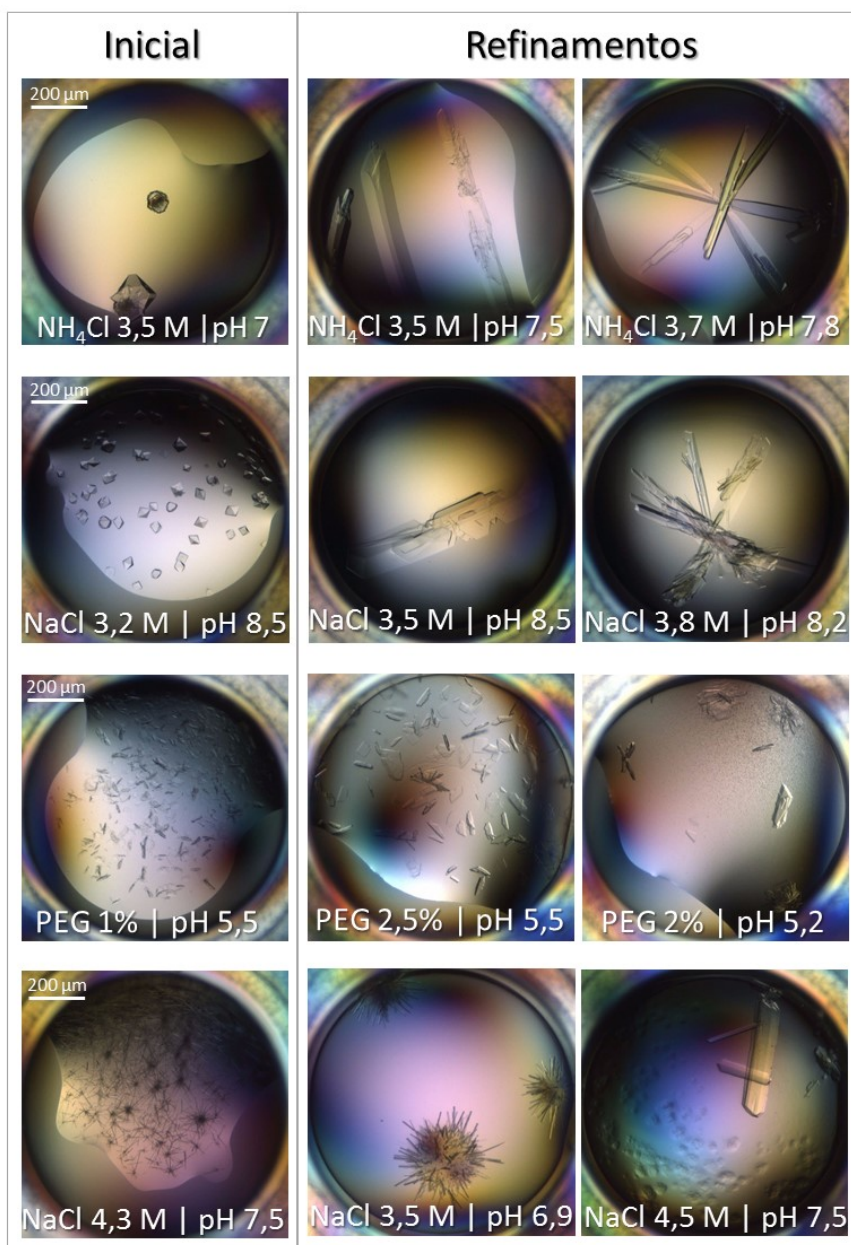


Figura 27. Cristais de KGA C-terminal resultantes dos refinamentos de cristalização a partir das condições descritas na tabela 6. O componente refinado está indicado na figura, assim como as variações de pH ou de concentração realizadas.

Entre os inúmeros cristais obtidos na prospecção inicial de condições e no refinamento, 30 deles foram pescados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e enviados para o *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource* (SSRL, Menlo Park, CA, EUA). As amostras foram submetidas a um processo de triagem automatizado para verificar sua qualidade e direcionar a escolha dos cristais para a coleta do conjunto completo de dados. Os melhores conjuntos foram obtidos a partir das seguintes condições de cristalização: (a) 3,2 M NaCl; 0,1 M Tris pH 8,5 (4°C) e (b) 3,8 M NH₄Cl; 0,1 M Bis-Tris Propano pH 7 (18°C). Tais condições resultaram em cristais pertencentes, respectivamente, aos sistemas tetragonal (grupo espacial P4₃2₁2) e monoclinico (grupo espacial P12₁1). O modelo molecular de maior resolução

(1,41 Å de resolução máxima), obtido a partir dos cristais tetragonais, foi produzido a partir de faseamento experimental por SAD utilizando os quatro átomos intrínsecos de enxofre como espalhadores anômalos (3 resíduos de metionina e 1 de cisteína). Por sua vez, o modelo obtido por SAD foi usado no faseamento por substituição molecular dos conjuntos de dados obtidos a partir dos cristais monoclinicos (1,74 Å) (Estatísticas cristalográficas na Tabela 7).

Tabela 7. Estatísticas da coleta de dados, processamento, faseamento e refinamento dos modelos para os conjuntos de S-SAD e nativo de KGA C-terminal. Valores entre parênteses se referem à camada externa de resolução.

Conjunto de dados	S-SAD	Nativo tetragonal	Nativo monoclinico
PDB ID	-	5U0I	5U0J
Linha de luz	SSRL 12-2	SSRL 12-2	SSRL 12-2
Comprimento de onda (Å)	1,771	0,9795	0,9795
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P12 ₁ 1
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a = b = 75,3; c = 88,7	a = b = 75,3; c = 88,3	a = 76,5; b = 47,2; c = 115,7 (β = 90,1°)
Faixa de resolução (Å)	29,57 – 2,60 (2,72 – 2,60)	75,0 – 1,42 (1,45 – 1,42)	64,0 – 1,72 (1,75 – 1,72)
Número de reflexões únicas	8322 (992)	48.262 (2342)	82.659 (4.303)
R _{pim} (%)	0,8 (1,7)	2,6 (30,9)	2,4 (31,8)
Completeza (%)	100 (100)	100 (100)	94,1 (92,1)
Redundância	44,5 (41,4)	22,7 (23,2)	6,4 (6,3)
Completeza anômala	100 (100)	-	-
Redundância anômala	24,4 (21,8)	-	-
I / σ (I)	69,4 (40,3)	17,1 (2,9)	15,7 (2,1)
CC(1/2)	0,999 (0,999)	0,994 (0,441)	0,999 (0,902)
Mosaicidade média (°)	0,25	0,62	0,55
B-factor de Wilson Plot (Å ²)	21,4	13,6	25,7
Monômeros/Unidade assimétrica	2	2	4**
Conteúdo de solvente (%)	46,7	46,7	36,4**
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2,32	2,32	1,93**
Refinamento			
Faixa de resolução (Å)	-	57,3 – 1,42	64,0 – 1,72
Reflexões (validação cruzada, %)	-	2.500 (5,2%)	4.285 (5,2%)
R _{factor} / R _{free} (%)	-	14,5 / 17,9	18,3 / 22,2
Clashscore	-	2	2
Outliers de cadeia lateral (%)	-	0,6	0,7
Outliers RSRZ (%)	-	1,6	0,6
B médio – todos os átomos (Å ²)	-	22,2	34,9
Átomos de proteína	-	1.506	2.943
Moléculas de água	-	285	640
Átomos inorgânicos	-	1 Cl ⁻ , 3 Na ⁺	6 Na ⁺
Desvio da idealidade (RMS)			
Comprimento da ligação (Å)	-	0,015	0,019
Ângulo da ligação (°)	-	1,313	1,454
Análise de Ramachandran			
Regiões mais favoráveis (%)	-	98,0	98,6
Regiões permitidas (%)	-	2,0	1,4
Regiões proibidas (%)	-	0	0

** Simetria não-cristalográfica translacional foi detectada para este conjunto de dados.

De modo geral, o domínio C-terminal de KGA contém três repetições *ANK* (nomeadas ANK1 a ANK3) e é bastante similar ao domínio correspondente de GAB (*liver-type* glutaminase) (80% de identidade) em termos de estrutura global (r.m.s.d de 0,5 Å sobre 89 posições equivalentes de Cα) (Figura 28A). A estrutura da região C-terminal de GLS2 foi obtida paralelamente em nosso grupo pelo Dr. Igor M. Ferreira. As maiores variações estruturais (de 1,3 a 1,8 Å) entre as cadeias principais das duas estruturas ocorrem no β -hairpin que une as repetições ANK2 e ANK3 (β -hairpin 2) e os menores desvios observados (< 0,15 Å) correspondem às α -hélices internas e externas de ANK2.

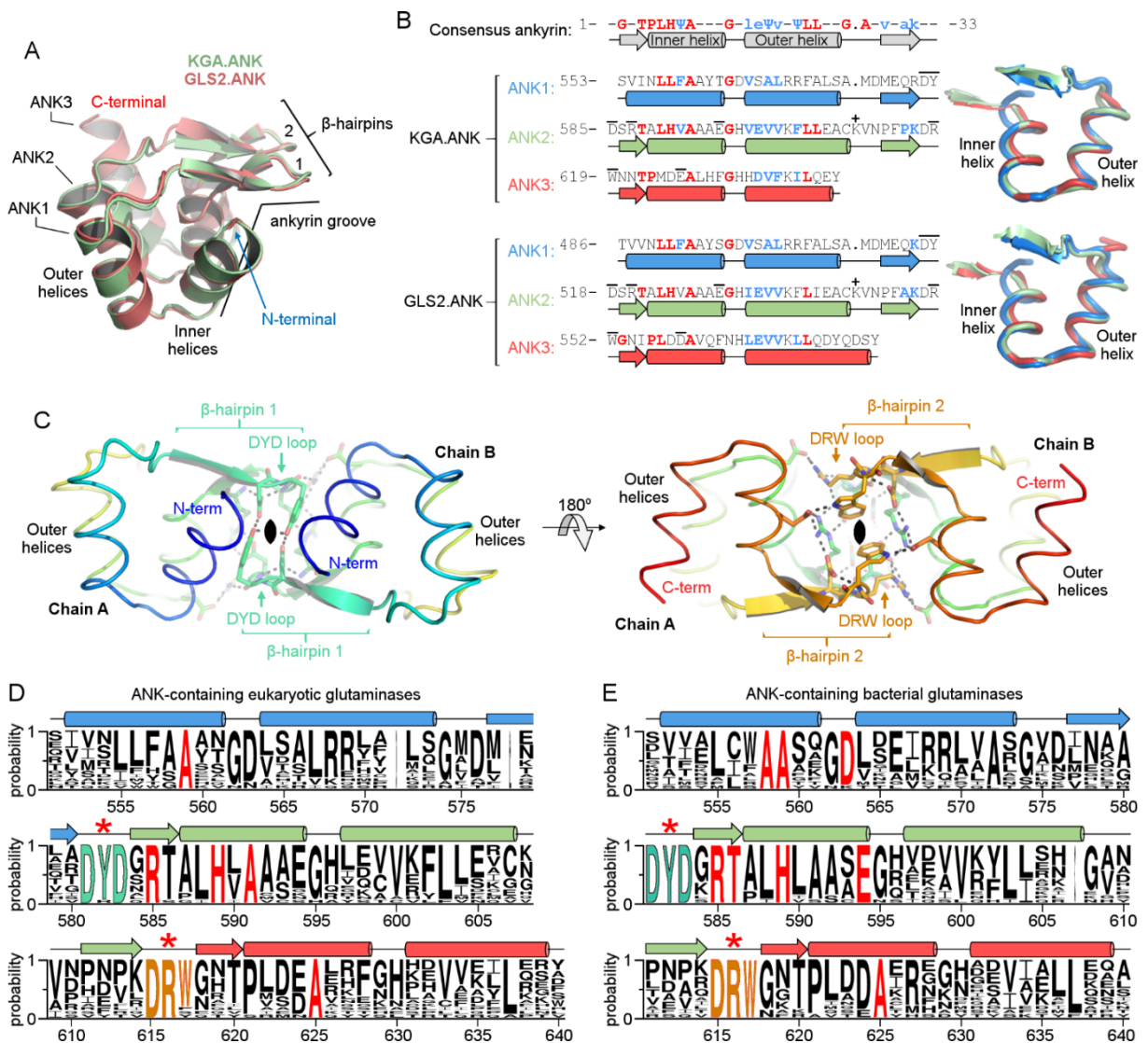


Figura 28. Características estruturais gerais dos domínios ANK de glutaminases. (A) Representação em *cartoon* das três repetições ANK (ANK1 a ANK3) presentes como um domínio C-terminal de KGA e GLS2. Ambas as glutaminases apresentam domínios ANK muito similares entre si, tanto em sequência quanto em estrutura. As hélices internas e externas, assim como os β -hairpins 1 e 2 que interligam ANK1-ANK2 e ANK3-ANK4, respectivamente, estão indicadas na figura. A superfície côncava formada pelo empilhamento de repetições adjacentes, chamada de *ANK groove*, também está

representada. **(B)** Alinhamento das repetições ANK das glutaminases KGA e GLS2 com a sequência consenso (mostrada no topo) proposta por Mosavi, Minor, & Peng 2002. Resíduos altamente conservados estão capitalizados e em vermelho, resíduos semiconservados estão em azul. Ψ indica resíduo hidrofóbico. Resíduos que coincidem com a sequência consenso estão marcados da mesma cor em relação ao resíduo consenso. As barras indicam os resíduos envolvidos na formação do homodímero. ANK2 de ambas KGA e GLS2 contém uma lisina extra exposta a superfície (indicada por "+") na posição 28 (Lys611 de KGA e Lys543 de GLS2). À direita do alinhamento, estão representadas as sobreposições das três repetições de KGA (acima) e de GLS2 (abaixo). **(C)** Representação das interfaces homodiméricas das cadeias A e B do domínio ANK de KGA. As cadeias laterais dos motivos DYD localizados no β -*hairpin* 1 (à esquerda) e DRW localizados no β -*hairpin* 2 (à direita) estão representadas em *sticks*. **(D)** Representação da conservação das sequências ANK de glutaminases eucarióticas e **(E)** bacterianas. O tamanho das letras é proporcional ao grau de conservação dos resíduos. Os motivos DYD e DRW estão destacados em *cyan* e laranja, respectivamente, e por asteriscos vermelhos (*) para indicar alto grau de conservação destes motivos; em vermelho, estão marcados os resíduos com 100% de identidade entre as sequências alinhadas. Os resíduos estão enumerados de acordo com a sequência de KGA humana.

As sequências primárias das repetições ANK de glutaminases divergem das repetições ANK canônicas quanto ao motivo conservado TPLH, que inicia as hélices internas e estabilizam as repetições ANK através de ligações de hidrogênio recíprocas entre os resíduos de treonina e histidina (Sedgwick et al. 1999; Mosavi, Minor, & Peng 2002) (Figura 28B). Em ANK2 de KGA, a ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxil da treonina e imidazol da histidina são preservados, mas este motivo é divergente em ANK1 e ANK3. Normalmente, as repetições que flanqueiam as extremidades dos domínios ANK – neste caso, ANK1 e ANK3 – apresentam maior desvio em relação a sequência consenso devido à exposição ao solvente. Em ANK1, a hélice interna é meia volta mais longa do que as usualmente observadas em repetições ANK. Em ANK3, a histidina é substituída por aspartato, impedindo a ligação de hidrogênio conservada entre os grupos hidroxil-imidazol. A volta β 1 está ausente em ANK1 e em ANK2 há inserção de um resíduo no C-terminal da hélice externa, uma lisina exposta a superfície (Lys611).

A busca por um conjunto biologicamente relevante na estrutura cristalina de KGA C-terminal foi feita usando o servidor online PISA (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*, Krissinel & Henrick 2007), o qual identificou uma interface termodinamicamente estável envolvida na formação de homodímero, com ganho de energia livre de solvatação pela formação de interface igual a $-5,4 \text{ kcal.M}^{-1}$ (Tabela 8) (Figura 28C). Esta interface oclui quase 800 \AA^2 em área e corresponde à interação *groove-to-groove* dos domínios ANK de glutaminases. Os contatos polares (ligações de hidrogênio e pontes salinas) são divididos majoritariamente entre os *loops* do tipo β -*hairpin* 1 (conectando ANK1 e ANK2) e 2 (conectando ANK2 e ANK3) da cadeia A

e seus respectivos equivalentes da cadeia B (Figura 28C, à esquerda, β -*hairpin* 1 e à direita, β -*hairpin* 2). Interações polares adicionais entre o β -*hairpin* 1 e a hélice interna de ANK3, como também entre o β -*hairpin* 2 e a hélice interna de ANK2 ocorrem simetricamente em relação às cadeias complementares.

Tabela 8. Interfaces homodiméricas termodinamicamente estáveis, previstas por PISA, para cada uma das estruturas ANK de glutaminases.

	Área da Interface (Å ²)	Ganho de energia livre (Kcal/mol)	Ligações de hidrogênio	Pontes salinas
KGA	798.1	-5.4	12	12
GLS2	789.0	-4.6	11	10

Observamos que a extensa rede polar que define a interface dimérica é ditada por dois *loops* curtos de β -*hairpins* 1 e 2, respectivamente compostos pelos motivos Asp-Tyr-Asp (resíduos 583-585 em KGA e 516-518 em GLS2) e Asp-Arg-Trp (617-619 em KGA e 550-552 em GLS2). Para simplificar, nomeamos estes motivos como *loops* DYD e DRW (Figura 27C). Foi realizado um alinhamento das sequências dos domínios ANK de glutaminases eucarióticas e bacterianas para identificar o grau de conservação dos motivos DYD e DRW (Figura 28D e 28E). Observamos que estes motivos são quase 100% conservados entre as sequências alinhadas, apesar da identidade sequencial das Repetições ANK de glutaminases em geral ser relativamente baixa.

5.3.2. Determinação da estrutura completa de KGA humana.

Para uma primeira prospecção de condições de cristalização, a construção KGA 124-669, equivalente à glutaminase madura resultante do processamento da porção N-terminal, após entrada na mitocôndria, foi purificada e concentrada até 11 mg.mL⁻¹. Nesta varredura inicial, cerca de 1.000 condições foram testadas, envolvendo duas temperaturas diferentes (4 e 18°C) e 6 kits de cristalização de 72 ou 96 condições. Foram obtidos cristais em 3 condições de cristalização diferentes a 4°C (Figura 29).

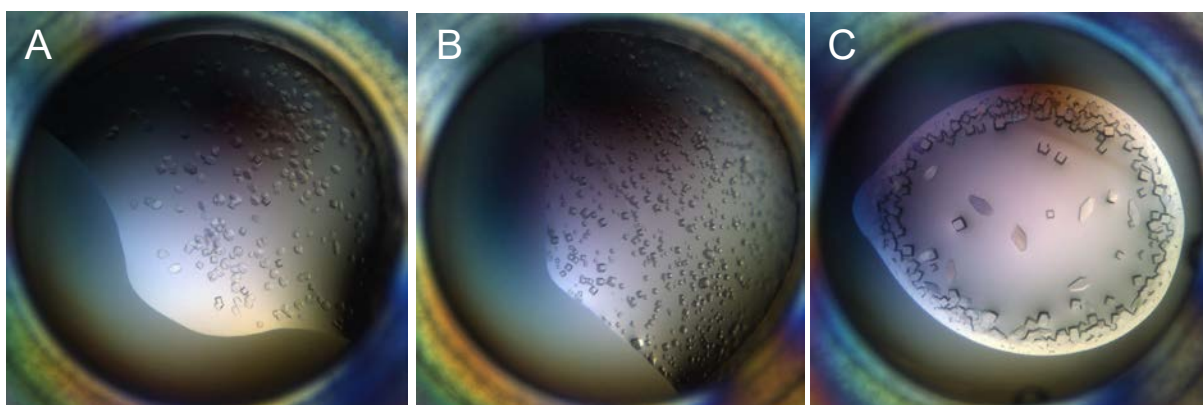


Figura 29. Resultados do *screen* inicial de cristalização de KGA humana (124-669). As condições que cristalizaram, a 4°C, foram: 28 **(A)** e 29 **(B)** do kit SaltRx HT da Hampton Research e 16 do Wizard I&II (Emerald BioSystems) **(C)**.

Posteriormente, foram feitos refinamentos de cada uma das condições de cristalização iniciais. A condição final de cristalização da proteína foi obtida pela adição de seu inibidor BPTES. As gotas de cristalização foram feitas manualmente por gota sentada, misturando duas partes da proteína com uma parte da solução mãe, contendo Formato de Sódio 1,8 M; Cloreto de Sódio 0,5 M e Bis-Tris Propano 0,1 M pH 6,8 (Figura 30).

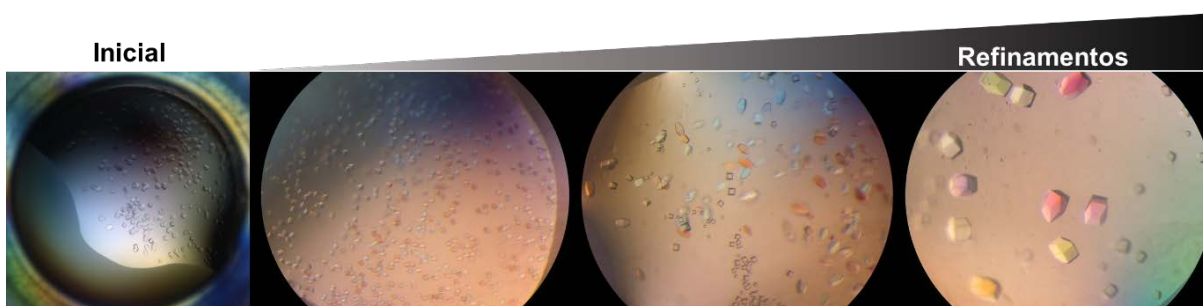


Figura 30. Etapas do refinamento de condições de cristalização para KGA 124-669. Na condição final, a proteína purificada foi concentrada para 7,5 mg.mL⁻¹ e previamente incubada com BPTES a 1,2 mM final. Foram adicionados 2 µL da amostra à gota de cristalização, juntamente com 1 µL de solução mãe contendo BIS TRIS propano 0,1 M pH 6,8; formato de sódio 1,8 M e NaCl 0,5 M. As gotas de cristalização foram preparadas manualmente por gota sentada e as placas foram mantidas a 4°C, temperatura definida como ideal para o crescimento dos cristais de KGA.

Os cristais resultantes do refinamento foram pescados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e enviados para coleta no *Diamond Light Source* (Didcot, Oxford, Reino Unido). A análise inicial do conjunto de dados de difração de raios-X permitiu a identificação de parâmetros de cela unitária extensos e alto teor de solvente, de aproximadamente 78% (Tabela 9). Os dados foram processados em P4₂2₁2 e o faseamento foi feito por substituição molecular, usando como modelos de

busca, as coordenadas dos domínios N-terminal e glutaminase de GAC ligada a BPTES (PDB ID 4jkt) e o dímero de KGA ANK aqui descrito. No total, a unidade assimétrica compreende cinco monômeros de KGA, quatro deles formando um tetrâmero canônico (dímero de dímeros), enquanto o quinto monômero se relaciona com outro tetrâmero por simetria cristalina 2₁. O modelo final foi refinado até a convergência, alcançando R_{factor} e R_{free} de 27,3 e 31,8%, respectivamente.

O tetrâmero completo de KGA contendo o domínio ANK está representado na Figura 31A. Os dímeros ANK da estrutura de KGA completa (superfície verde na Figura 31B) estão espacialmente situados entre os domínios N-terminais EF-*hand-like* (superfícies azuis). Uma característica notável é que os dímeros ANK posicionam-se do mesmo lado do plano seccional definido pelos dois eixos mais longos da proteína, o qual divide os tetrâmeros em metades frontais e posteriores (Figura 31B), rompendo assim a simetria diedral dupla previamente estabelecida para as estruturas de glutaminases resolvidas sem a presença do domínio C-terminal (Cassago et al. 2012).

O modelo de baixa resolução não permite a identificação das interações de cadeia lateral específicas compartilhadas entre os dímeros ANK e os domínios N-terminais EF-*hand-like*. Porém, observa-se claramente a proximidade entre a hélice externa de ANK1 da cadeia A com a hélice H1 da cadeia B do domínio N-terminal EF-*hand-like*, ambos contendo resíduos polares longos expostos, como ácido glutâmico e arginina (Figura 31C). Um arranjo equivalente é observado para a hélice externa de ANK1 da cadeia C com a hélice H1 do domínio N-terminal da cadeia D.

Por fim, observamos na Figura 31D que os dímeros de ANK se posicionam justamente na posição onde estão presentes, na estrutura de GAC, as chamadas interfaces de filamentação. Trata-se de uma região formada entre domínios N-terminais de dois dímeros de GAC e, através da qual devem ocorrer os contatos entre os tetrâmeros para a formação dos filamentos de fita simples observados anteriormente pelo nosso grupo (Ferreira et al. 2013).

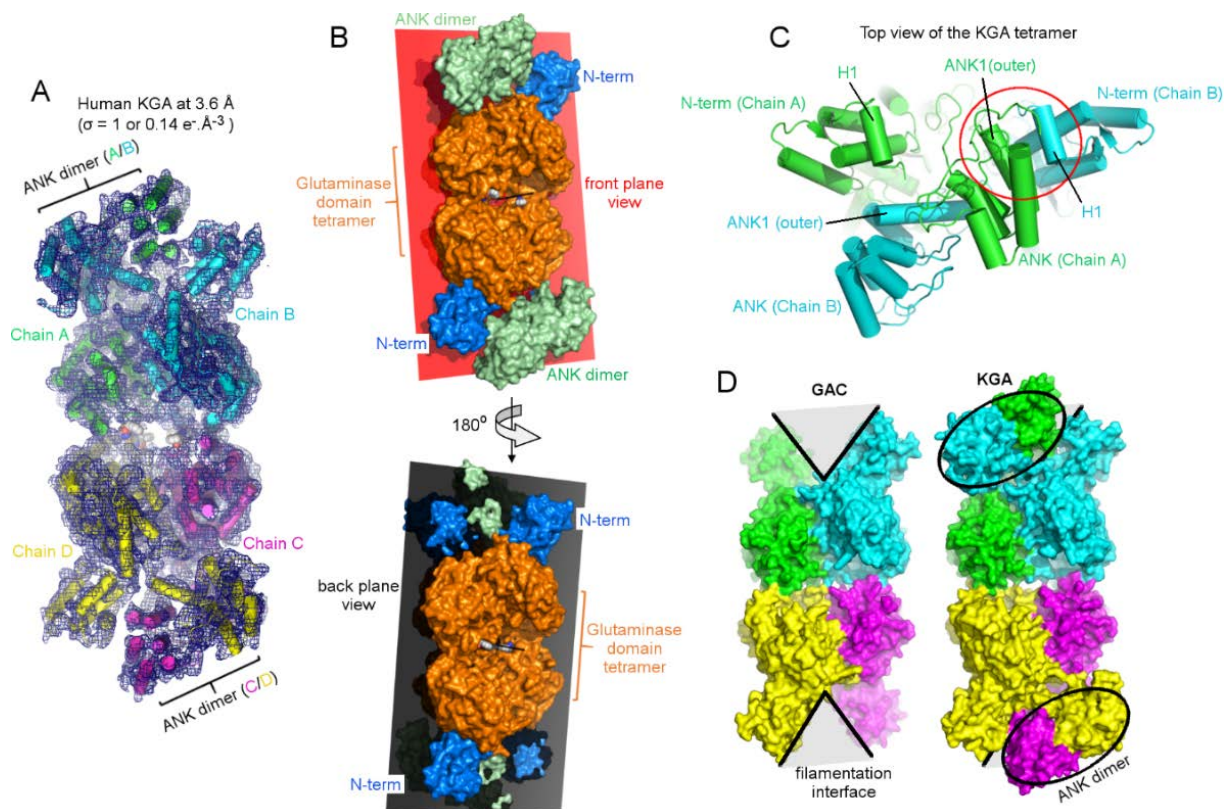


Figura 31. Estrutura de KGA completa e caracterização biofísica de KGA, GAC e ΔC . **(A)** Densidade eletrônica e modelo final determinado para o tetrâmero completo de KGA. **(B)** Representação planar, dividindo os tetrâmeros em metades anterior e posterior para mostrar que o posicionamento dos dois dímeros ANK ocorre do mesmo lado do plano. **(C)** Vista superior do tetrâmero, indicando a proximidade espacial entre a hélice externa de ANK1 da cadeia A e a hélice H1 do domínio N-terminal da cadeia B. **(D)** A interface do filamento entre dois domínios N-terminais (região delimitada em cinza), pelo qual ocorre o crescimento do polímero de fita simples de GAC (PDB ID 4jkt), está ocluído em KGA devido à presença dos dímeros ANK.

Tabela 9. Estatísticas de coleta de dados, processamento e refinamento da estrutura de KGA. Os valores entre parênteses se referem à última faixa de resolução.

PDB ID	5UQE
Linha de luz	I03 – Diamond Light Source
Comprimento de onda (Å)	0,9762
Grupo espacial	P4 ₂ 2 ₁ 2
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a = b = 144,1; c = 615,2
Faixa de resolução (Å)	50,0 – 3,60 (3,67 – 3,60)
Número de reflexões únicas	76.934 (4.463)
R _{pim} (%)	7,4 (49,4)
Completeza (%)	100 (100)
Redundância	23,4 (20,8)
I / σ (I)	5,1 (1,5)
CC (1/2)	0,998 (0,716)
Mosaicidade média (°)	0,30
B-factor de Wilson Plot (Å ²)	92,4
Monômeros/Unidade assimétrica	5
Conteúdo de solvente (%)	77,1
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Da)	5,37
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	50,0 – 3,6

Reflecções (validação cruzada**)	7,160 (5%)
R_{factor} / R_{free} (%)	27,3 / 31,8
Clashscore	10
Outliers de cadeia lateral (%)	3,0
Outliers RSRZ (%)	6,9
B médio – todos os átomos (Å²)	142,0
Átomos de proteína	19.617
Moléculas de água	0
Átomos inorgânicos	0
Moléculas de ligantes	3 BPTES
Desvio da idealidade (RMS)	
Comprimento da ligação (Å)	0,008
Ângulo da ligação (°)	1,384
Análise de Ramachandran	
Regiões mais favoráveis (%)	86,8
Regiões permitidas (%)	9,9
Regiões proibidas (%)	3,3

5.4. Ensaios de atividade das construções de KGA.

Foi demonstrado anteriormente por nosso grupo que a excepcional eficiência enzimática fosfato-dependente da isozima GAC é resultado de sua habilidade de se auto agrupar em filamentos helicoidais supratetraméricos que favorecem a acessibilidade do substrato ao sítio ativo (Ferreira et al. 2013). KGA, por sua vez, se mostrou incapaz de se agrupar em estruturas filamentosas longas. Baseado na nova estrutura cristalográfica de KGA aqui apresentada, levantamos a hipótese de que a presença de repetições ANK entre os domínios N-terminais possam diminuir a habilidade desta proteína em formar filamentos por impedimento estérico, reduzindo, assim, sua capacidade enzimática. Para testar esta hipótese, utilizamos a construção de GLS com o C-terminal truncado (resíduos 124-550, ΔC), contendo os domínios comuns entre KGA e GAC. Ensaios de atividade foram realizados utilizando 10 nM de glutaminase e 20 mM de P_i , a fim de comparar a atividade das três proteínas (KGA, GAC e ΔC) (Tabela 10 e Figura 32A e 32B). Concluímos que a construção ΔC apresenta maior eficiência enzimática. Outra observação sobre ΔC diz respeito à sua maior heterogeneidade em termos de dispersão, indicada pelas medidas do raio hidrodinâmico (ou raio de Stokes aparente) calculado a partir dos perfis cromatográficos de gel-filtração) quando comparada com KGA e GAC (Figura 32C). Por fim, a alta heterogeneidade de ΔC é indicativo de uma maior capacidade para formação de filamentos.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos obtidos por ensaio de atividade das diferentes construções de glutaminases.

Enzima	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	Eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) ($mM^{-1}.s^{-1}$)	$V_{máx}$ (picomols. s^{-1})	R^2
KGA	$34,69 \pm 1,0$	$12,14 \pm 0,9$	$2,86 \pm 0,2$	34,7	0,990
GAC	$30,60 \pm 0,7$	$1,43 \pm 0,2$	$21,38 \pm 3,0$	30,6	0,992
ΔC	$38,32 \pm 0,7$	$1,69 \pm 0,2$	$22,71 \pm 2,2$	38,3	0,984

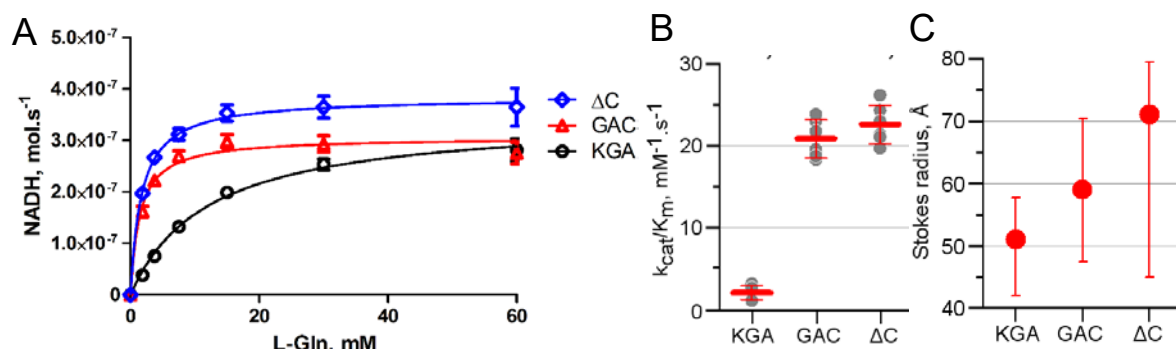


Figura 32. As glutaminases KGA e GAC em comparação com a construção envolvendo apenas a região comum entre elas, ΔC . **(A)** As curvas de Michaelis-Menten para as três construções de glutaminases foram determinadas a partir de ensaios enzimáticos, utilizando 10 nM de enzima, 3 unidades de GDH, 2 mM de NAD e 20 mM de Pi, incubados com concentrações crescentes de L-glutamina. A formação de NADH foi monitorada por absorvância a 340 nm. As velocidades iniciais foram plotadas em função da concentração de glutamina e ajustadas usando GraphPad Prism 5.0. **(B)** Os valores de eficiência enzimática, calculados a partir da razão K_{cat}/K_m , se mostraram drasticamente reduzidos para KGA em comparação com GAC e com a construção no qual o C-terminal está ausente. As linhas vermelhas indicam média \pm desvio padrão. **(C)** Os perfis de distribuição por tamanhos em coluna de cromatografia de gel-filtração foram obtidos e os raios hidrodinâmicos aparentes (em Å) foram calculados a partir da curva de calibração da coluna. Observa-se que as regiões C-terminais de glutaminases, em especial o domínio ANK, podem ser os responsáveis por dificultar a formação de filamentos oligoméricos por impedimento estérico.

5.5. Estudos evolutivos de KGA.

Análises evolutivas foram feitas utilizando 2.796 sequências proteicas de glutaminases bacterianas e 789 eucarióticas, selecionadas a partir de uma consulta no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, blast.ncbi.nlm.nih.gov) – busca blastp contra a base de dados de sequências não redundantes (nr) de proteínas (valor-E $\leq 0,0001$) – utilizando a região correspondente ao domínio glutaminase de GLS humana (Ile221-Arg544) como sujeito de busca. A título de observação, não foi encontrado nenhum homólogo de glutaminase em *Archaea*. Um levantamento inicial do tamanho das sequências bacterianas indicou uma distribuição normal centrada em 313 ± 10 aminoácidos de comprimento (Figura 33A). Esta distribuição envolveu ~85% das sequências usadas (2.387), sugerindo a predominância, em bactéria, de glutaminases de domínio único, contendo somente o *fold* de glutaminase canônico autônomo. Das sequências restantes analisadas, cerca de 10% (282) contribuem para uma segunda distribuição Gaussiana, com 429 ± 16 aminoácidos. Análises detalhadas indicam que

a única arquitetura presente neste subgrupo compreende a adição de um domínio putativo denominado STAS (*Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist*), localizado a C-terminal do domínio canônico de glutaminase (Figura 33A). Por último, 4% (109) das sequências bacterianas de glutaminases se agrupam em uma terceira distribuição, centrada em 613 aminoácidos de comprimento, com desvio padrão igual a 10. Em sua maioria, estas sequências mais longas apresentam, em adição ao domínio STAS, um domínio extra chamado cNMP (*Cyclic Nucleotide-binding domain*). Nota-se também a existência de três sequências de cianobactérias com arquitetura na qual a porção glutaminase é flanqueada a N-terminal por um domínio EH-like (*Eps15 homology-like*) e a C-terminal por dois domínios de repetições ANK em série (Figura 33A). O domínio EH-like consiste em um par de motivos EF-hand que reconhece proteínas contendo motivos Asn-Pro-Phe (Di Fiore, Pelicci, & Sorkin 1997).

De maior interesse, entretanto, são as 17 de 27 sequências *outlier* com comprimentos entre 510 e 590 aminoácidos situadas, portanto, entre a segunda e a terceira distribuição (oval azul, Figura 33A), cuja arquitetura consiste na porção glutaminase flanqueada por domínios EH-like e por um domínio ANK, respectivamente, nas regiões N- e C-terminais. Este tipo de arquitetura foi identificado em proteo- e actinobactérias, sendo similar a dos representantes de cianobactérias acima mencionados.

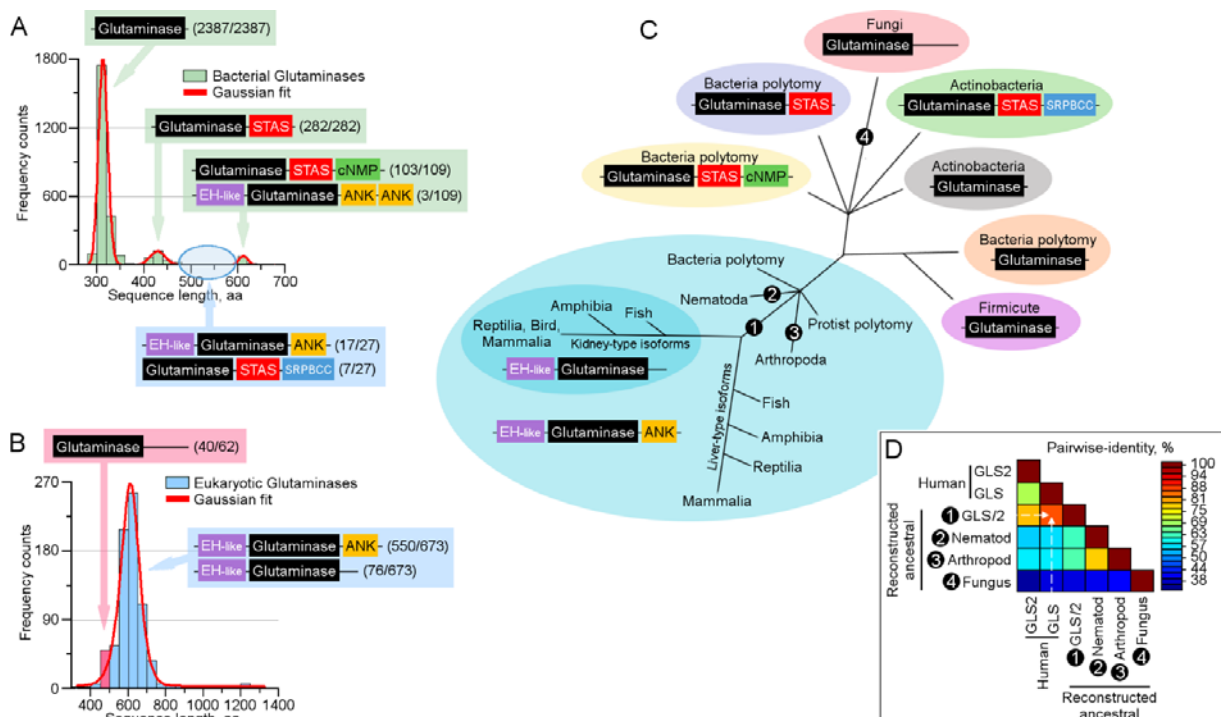


Figura 33. Análises das sequências e arquiteturas de glutaminases eucarióticas e bacterianas. A sequência de aminoácidos correspondente ao domínio glutaminase do gene *GLS* (Ile221-Arg544) foi

usado como sujeito de busca blastp contra o banco de dados de sequências de proteínas não-redundantes (valor- $E \leq 1e^{-4}$). As sequências obtidas foram analisadas pelo número de aminoácidos (aa); a distribuição normal dos tamanhos das sequências de glutaminases bacterianas e eucarióticas estão respectivamente representadas em (A) e (B), com as respectivas arquiteturas indicadas em retângulos. Entre parênteses, está o número de sequências contendo a respectiva arquitetura / o número total de sequências contidas na região indicada do gráfico de distribuição. (C) Cladograma baseado na organização por arquiteturas feito a partir da árvore filogenética construída utilizando abordagem de máxima verossimilhança. (D) A árvore filogenética e o respectivo alinhamento foram usados para reconstruir as sequências de proteínas ancestrais para nodos específicos (cordados ancestrais (1), nematódeos (2), artrópodes (3) e fungos (4)) usando abordagem de máxima parcimônia. As sequências ancestrais obtidas foram alinhadas com GLS (KGA e GAC) e GLS2 (GAB e LGA) humanas e a similaridade sequencial foi representada como um *heatmap* de distâncias par-a-par construído em SDT usando alinhamento MUSCLE. O resultado obtido sugere que GLS é o gene mais primitivo, o qual foi então duplicado para gerar GLS2. STAS: *Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist*; cNMP: *Cyclic Nucleotide-binding domain*; EH: *Eps15 homology*; ANK: *ankyrin repeat*; SRPBCC: START/RHOalphaC/PITP/Bet v1/CoxG/CalC.

Por sua vez, as sequências de glutaminases eucarióticas – que pertencem majoritariamente aos reinos *Animalia* e *Fungi* – são consistentemente mais longas e compreendem uma única distribuição Gaussiana, com média de 631 aminoácidos (norma em 615) e desvio padrão assimétrico de 45 aminoácidos para as sequências mais curtas e 26 aminoácidos para as mais longas em relação à média (Figura 33B). Na extremidade esquerda da distribuição, estão contidas as glutaminases de fungos, com comprimento de 450 e 500 aminoácidos e apresentam uma arquitetura única em que o domínio glutaminase é seguido por um C-terminal consistentemente longo (156 ± 7 aminoácidos) com função indefinida (barra rosa, Figura 33B). As glutaminases eucarióticas restantes de comprimentos maiores do que 500 aminoácidos pertencem quase que exclusivamente ao reino *Animalia* e tem sequências N-terminais de extensões variáveis. A região N-terminal imediatamente anterior ao domínio glutaminase tem níveis consideráveis de identidade sequencial ($> 40\%$) com a equivalente em GAC humana e de camundongo, que conhecidamente forma um feixe de quatro hélices *EF-hand-like* estruturalmente similar ao domínio *EH-like* (encontrado em bactérias, conforme descrito acima) (Cassago et al. 2012). Portanto, pode-se assumir de maneira confiável que parte da extensão N-terminal de todas estas glutaminases eucarióticas deve se dobrar em uma estrutura *EH-like*, de modo similar ao observado em GAC (conforme representado na Figura 33A e 33B).

Repetições ANK putativas são preditas em cerca de 550 das sequências mais longas de glutaminases eucarióticas e estão localizadas, sem exceção, na porção C-terminal em relação ao domínio glutaminase. Outras 76 sequências, todas de origem mamífera, apresentam um C-terminal mais curto que se assemelha à GAC

humana em termos de sequência (Figura 33B). Foram identificadas algumas poucas sequências (11 no total) pertencentes aos grupos eucarióticos *Haptophyta* e *Heterokonta*. Estas sequências têm comprimentos maiores, variando de 800 a 1250 aminoácidos, e algumas apresentam arquiteturas preditas de glutaminases contendo associações em tandem de dois domínios ANK. Tais sequências não foram incluídas nas análises aqui apresentadas.

Com o intuito de investigar a relação evolutiva entre as glutaminases homólogas baseadas em sua organização por arquitetura, reconstruímos um cladograma não-enraizado usando sequências homólogas analisadas (Figura 33C). A árvore filogenética derivada apresenta uma organização taxonômica semelhante à encontrada em árvores filogenéticas baseadas em rRNA (Pace 2009). Muitos nodos não resolvidos (politomia) foram observados, particularmente para as glutaminases bacterianas. Acreditamos que esse fenômeno se deva ao fato de muitas espécies de bactérias conterem mais do que uma glutaminase, normalmente como resultado da combinação de uma proteína única com uma isoenzima de multidomínios. Com exceção das glutaminases fúngicas, que se agruparam mais próximas aos homólogos bacterianos, as proteínas eucarióticas tiveram uma árvore de melhor resolução. Protistas, nematódeos e artrópodes formam um grupo politômico com cordados, juntamente com as proteo- cianobactérias contendo domínios ANK; este agrupamento sugere que o aparecimento desta característica de multidomínios tenha sido um evento precoce, concomitante com a associação simbiótica relacionada ao surgimento dos eucariotos, já que arqueobactérias não carregam nenhum gene glutaminase-*like* em seu genoma. Uma divisão subsequente ligada ao aparecimento de variações múltiplas em torno da mesma arquitetura básica (EH-*like*+Glutaminase+ANK) sugere que o evento de duplicação gênica que produziu os genes *GLS* e *GLS2* e de diferenciação de isoformas (com o aparecimento de isoformas GAC-*like*; Figura 33B, oval azul escura) tenha surgido com os cordados. Entretanto, curiosamente, aves sofreram perda completa do gene *GLS2*.

Finalmente, a reconstrução teórica das glutaminases ancestrais para cada um dos galhos eucarióticos principais (cordados, artrópodes, nematódeos e fungos) sugere que a glutaminase mais primitiva adquirida de um ancestral bacteriano foi provavelmente KGA (KGA-*like* ou GLS-*like*, gene *gls*), conforme observado na Figura 33D. Em todas as sequências ancestrais reconstruídas, encontramos a mesma

organização geral de domínios (EH-like + glutaminase + ANK). Além disso, ao compararmos a identidade sequencial dos genes humanos *GLS* e *GLS2* com o gene ancestral comum hipotético de *Gnathostomata*, *GLS* parece ter sido contido ao longo da evolução de modo a manter a mesma função enquanto *GLS2* sofreu modificações mais significativas, provavelmente adquirindo novas funções e/ou mecanismos regulatórios.

Tendo estabelecido uma origem plausível para a arquitetura multidomínios de glutaminases, questionamos como se deu a evolução das diferentes variantes da enzima. Primeiramente, realizamos uma busca “top-down” por genes de glutaminases do filo *Cordata* usando a sequência genômica completa dos genes humanos *GLS* e *GLS2* como sujeitos de busca. Em seguida, identificamos regiões homólogas ao éxon 14 de *GLS* (após o qual ocorre o evento de *splicing* do gene) e ao éxon 15 (o chamado “éxon de GAC”).

Em cordados inferiores, verificamos que o genoma do tunicado ascídia (*C. intestinalis*) (Dehal 2002) apresenta um único gene *GLS-like* contendo 12 éxons. Uma região similar ao éxon 14 humano (70% de identidade, barra vermelha no ramo dos tunicados, Figura 34A) está inserida no éxon 11. O cefalocordado anfioxo (*B. floridae*) (Putnam et al. 2008) também tem um único gene de glutaminase, o qual, interessantemente apresenta somente dois éxons. Neste gene, a região homóloga ao éxon 14 humano está adequadamente localizada no limite 3’ do éxon 1; entretanto, nenhuma região de homologia ao éxon 15 de GAC foi identificado na sequência a jusante. Um evento de duplicação gênica foi observado adiante em lampreias (*P. marinus*, *Hyperortia*) (Smith et al. 2013), a qual gerou sequências distintas relacionadas aos genes humanos *GLS* e *GLS2*.

O condricte *Callorhinchus milii* (tubarão elefante) (Venkatesh et al. 2014) também tem duas glutaminases que são filogeneticamente relacionadas aos genes *GLS* e *GLS2*, sem nenhuma indicação de regulação por *splicing*. Entretanto, no gene *GLS-like*, a região homóloga ao éxon 15 humano pode ser observada pela primeira vez e devidamente identificada a jusante de uma sequência equivalente ao éxon 14, sugerindo, deste modo, uma origem para a variante de *splicing* GAC. O peixe-zebra (*Danio rerio*) (Howe et al. 2013) e outras espécies de peixes possuem 5 genes de glutaminase (representados pelo ramo dos *Actinopterygii*, Figura 34A), sugerindo eventos de duplicação autapomórfica subsequentes para ambos *GLS* e *GLS2*.

Interessantemente, a isoforma GAC foi mantida em ambas as cópias do gene *GLS*, apoiando a hipótese de que o éxon de GAC tenha aparecido anteriormente a esta duplicação; uma nova sequência *GLS-like* foi identificada em espécies contidas nesse galho.

Como observação, o anfíbio *Xenopus tropicalis* (rã africana) (Hellsten et al. 2010), com apenas uma cópia de ambos *GLS* e *GLS2*, aponta para uma compactação dos íntrons e éxons de *GLS2* contra um espalhamento de *GLS* ao longo de uma região genômica mais ampla (ramo Amphibia, Figura 34A). Finalmente, os genes de glutaminases humanas mantiveram a mesma arquitetura observada nos genes anfíbios, apesar dos comprimentos das sequências serem menores (ramo Amniota, Figura 34A).

A identificação de diversos elementos transponíveis como Alu e L2 (Figura 34B) dentro do íntron 15 de *GLS* humano fortemente sugere que a inserção do “éxon de GAC” tenha ocorrido devido a um evento de retrotransposição precoce; entretanto, nenhum elemento consenso correspondente foi encontrado no íntron 14. Mesmo após uma análise minuciosa por tblastn, não foi possível identificar uma região homóloga ao éxon 15 de GAC dentro do genoma humano, impedindo-nos, portanto, de propor uma localização original para esta sequência.

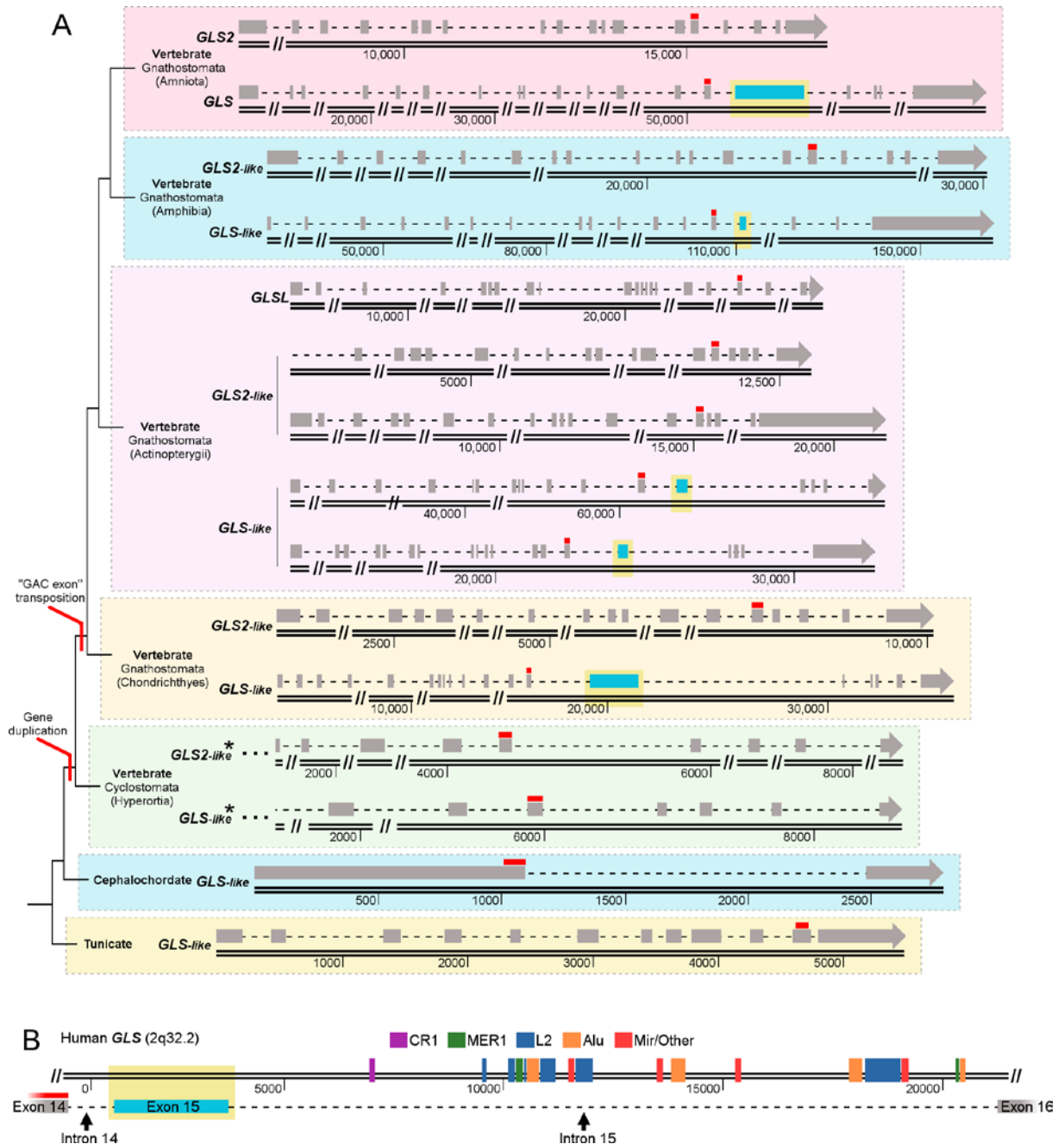


Figura 34. Reconstrução da história evolutiva da estrutura éxon-íntron dos genes *GLS* e *GLS2*. **(A)** A sequência proteica correspondente ao éxon 14 de *GLS* foi usado como sujeito de busca tblastn (*translated blast*) contra os genomas disponíveis de *Ciona intestinalis* (Tunicados), *Branchiostoma floridae* (Cefalocordados), *Petromyzon marinus* (Ciclostomados), *Callorhinchus milii* (Condrictes), *Danio rerio* (Actinopterygii) e *Xenopus tropicalis* (Anfíbios). Depois de encontrada uma região inicial de *Reciprocal Best Hit*, a posição correta do éxon foi determinada por alinhamento LALIGN par-a-par entre as sequências. A região localizada a jusante da sequência genômica do éxon 14 também foi avaliada por LALIGN contra o éxon exclusivo de GAC (éxon 15). Como ambas as sequências de glutaminases de *P. marinus* estão incompletas, os éxons disponíveis foram encontrados em contig usando abordagem LALIGN. Os genes humanos estão representados no topo (galho Amniota). As barras vermelhas finas representam a região homóloga do éxon 14 e as barras azuis claras indicam regiões homólogas ao éxon 15 de *GLS* humano. Os íntrons, representados em linhas pontilhadas, não estão representados em escala e as sessões omitidas estão indicadas por duas barras (//). O asterisco (*) em *Cyclostomata* indica que as sequências depositadas estão incompletas. **(B)** Uma busca por evidências de retrotransposição na região genômica envolvendo o éxon 15 e os íntrons 14 e 15 de *GLS* humano usando TranspoGene resultou na identificação de diversos elementos transponíveis no íntron 15; entretanto, nenhum elemento consenso correspondente foi encontrado no íntron 14.

5.6. Caracterização da interação entre glutaminases e PPAR γ .

A interação entre KGA e PPAR γ foi identificada em nosso laboratório através de ensaios de duplo híbrido de levedura. Esta mesma técnica foi utilizada para identificar que os domínios suficientes para mediar a interação são o N-terminal de KGA e o LBD de PPAR γ . Como o domínio N-terminal é idêntico entre as duas isoformas de glutaminase, KGA e GAC, decidimos incluir esta segunda isoforma nos estudos de interação com PPAR γ .

5.6.1. Ensaios de anisotropia de fluorescência.

Anteriormente à realização do ensaio, as construções hKGA Δ 1-123 (referida neste tópico como KGA) e hKGA Δ C (124-550, referida como Δ C), região comum entre GAC e KGA humanas, foram expressas de forma recombinante em *E. coli*, purificadas e marcadas com o fluoróforo FITC. Cada construção marcada foi individualmente titulada com a construção DBD-LBD de PPAR γ , previamente expressa de forma recombinante, purificada e concentrada para 470 μ M. A incubação foi feita na ausência de luz, a TA, por 24 horas, seguida de leitura de anisotropia de fluorescência no CLARIOstar (BMG Labtech).

O ensaio foi feito tanto na ausência quanto na presença de P_i a 20 mM para verificar possível efeito da ativação das glutaminases sob a interação. Na ausência de P_i , KGA apresentou maior afinidade ao PPAR γ ($K_{d-app} = 16 \mu$ M) em comparação a Δ C ($K_{d-app} = 28 \mu$ M). Por sua vez, a presença de P_i reduziu a afinidade de ambas construções por PPAR γ (K_{d-app} de 25 e 43 μ M, respectivamente) (Figura 35).

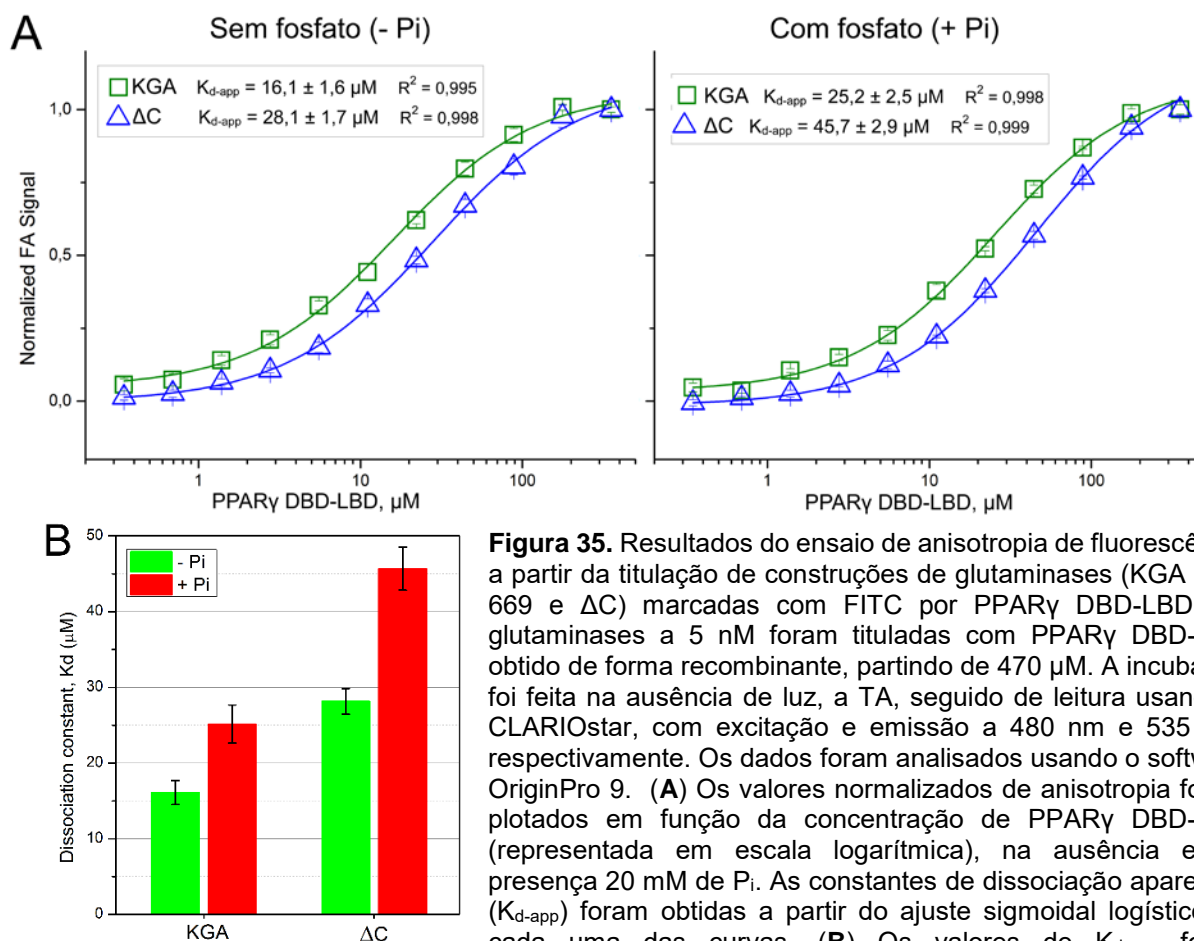


Figura 35. Resultados do ensaio de anisotropia de fluorescência a partir da titulação de construções de glutaminases (KGA 124-669 e Δ C) marcadas com FITC por PPAR γ DBD-LBD. As glutaminases a 5 nM foram tituladas com PPAR γ DBD-LBD obtido de forma recombinante, partindo de 470 μ M. A incubação foi feita na ausência de luz, a TA, seguido de leitura usando o CLARIOstar, com excitação e emissão a 480 nm e 535 nm, respectivamente. Os dados foram analisados usando o software OriginPro 9. **(A)** Os valores normalizados de anisotropia foram plotados em função da concentração de PPAR γ DBD-LBD (representada em escala logarítmica), na ausência e na presença 20 mM de Pi. As constantes de dissociação aparentes (K_{d-app}) foram obtidas a partir do ajuste sigmoidal logístico de cada uma das curvas. **(B)** Os valores de K_{d-app} foram

representados em um gráfico de barras para comparação das condições sem (-) Pi e com (+) Pi para cada uma das proteínas testadas.

Uma vez caracterizada a interação de KGA com a construção mais completa de PPAR γ envolvendo os dois domínios, DBD e LBD, o mesmo experimento de anisotropia foi realizado utilizando apenas a construção envolvendo o domínio LBD, a qual foi identificada por duplo híbrido como sendo suficiente para a interação. A construção utilizada inclui também a região flexível a N-terminal do LBD denominada *hinge*, sendo, portanto, referida como *hinge*-LBD.

Considerando que a região comum entre KGA e GAC, Δ C, seja suficiente para a interação e apresentou afinidade por PPAR γ semelhante a KGA, conforme observado no ensaio anterior, decidimos testar também a afinidade de GAC pelo receptor. Para tal, a construção mGAC Δ 1-128 também foi expressa de forma recombinante em *E. coli*, purificada e marcada com FITC.

A interação das glutaminases KGA e GAC com LBD apresentou afinidades semelhantes, com K_{d-app} em torno de 21 e 26 μ M, respectivamente (Figura 36A). Dois ligantes de PPAR γ , um agonista (RGZ) e um antagonista (GW9662), foram testados para avaliar a sua influência na interação com GLS. O DMSO foi utilizado como

controle negativo do experimento. Foi observado que ambos os ligantes elevam drasticamente o K_{d-app} da interação em relação à condição controle (DMSO), mas apresentam efeitos diferentes para cada isoforma. Para KGA, GW9662 diminuiu a afinidade por PPAR γ de forma mais acentuada em comparação com RGZ (K_{d-app} (GW) = 79 μ M *versus* K_{d-app} (RGZ) = 54 μ M) (Figura 36B). Entretanto, para GAC, RGZ foi o ligante que promoveu maior diminuição na afinidade quando comparada com GW9662 RGZ (K_{d-app} (GW) = 69 μ M *versus* K_{d-app} (RGZ) = 93 μ M) (Figura 36C).

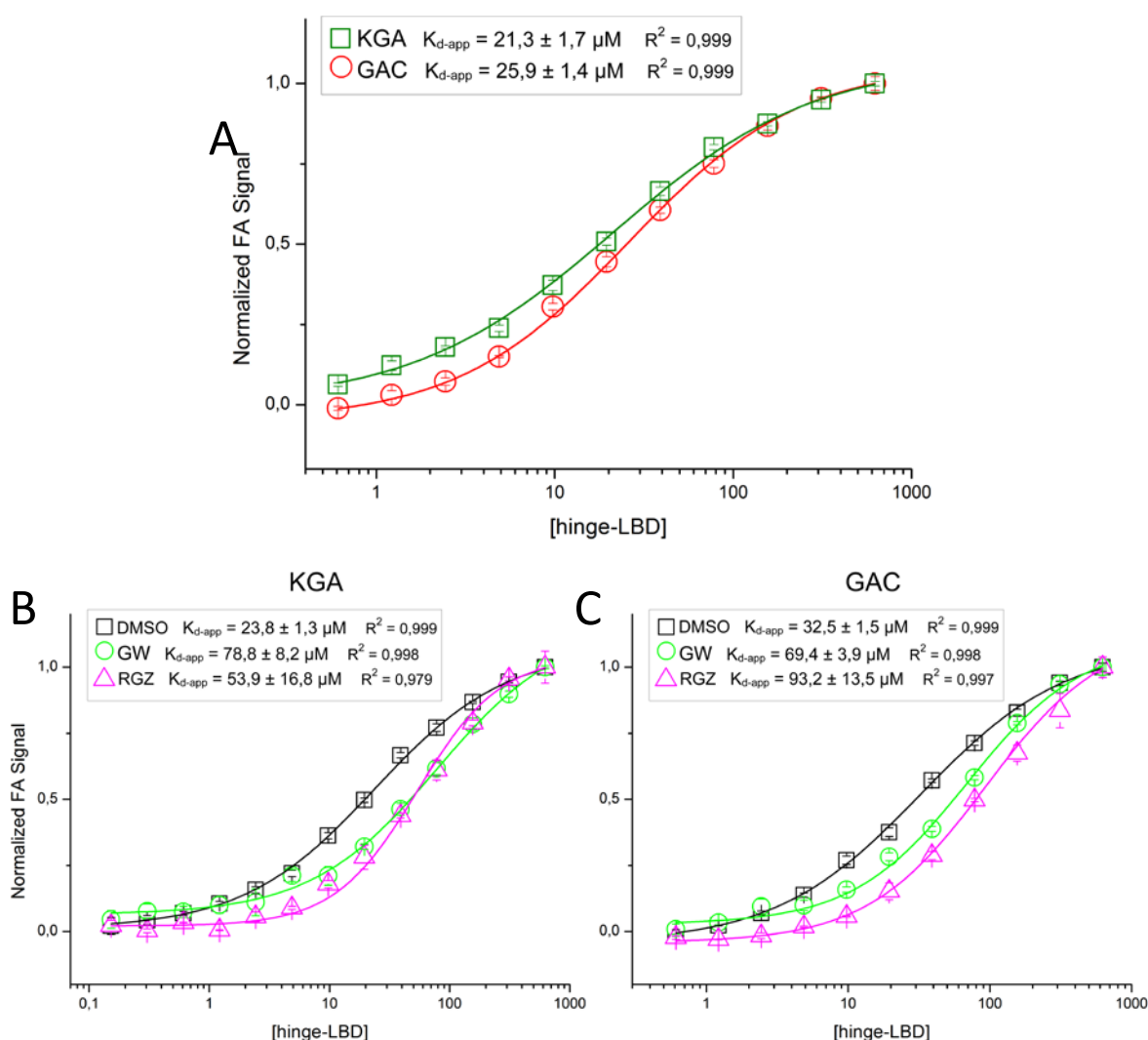


Figura 36. Resultados dos ensaios de anisotropia de fluorescência a partir da titulação por PPAR γ hinge-LBD de KGA e GAC marcadas com FITC. Em (A), estão representadas as curvas de anisotropia em função da concentração de PPAR γ (em escala logarítmica) obtidas na ausência de ligantes. Em (B) e (C), estão as curvas obtidas na presença dos ligantes de PPAR γ , RGZ e GW9662, ou na ausência deles (DMSO). As constantes de dissociação aparentes (K_{d-app}) foram obtidas a partir de ajuste sigmoidal logístico de cada uma das curvas usando OriginPro 9.

5.6.2. Ensaio de atividade de KGA na presença de PPAR γ .

Uma vez confirmada a interação através dos ensaios de anisotropia, entre KGA e PPAR γ obtidas de forma recombinante, decidimos investigar a relevância biológica desta interação. Deste modo, para avaliar o efeito de PPAR γ na atividade de KGA, realizamos ensaios de atividade de KGA na presença de excesso molar de PPAR γ (construção *hinge*-LBD) (Figura 37).

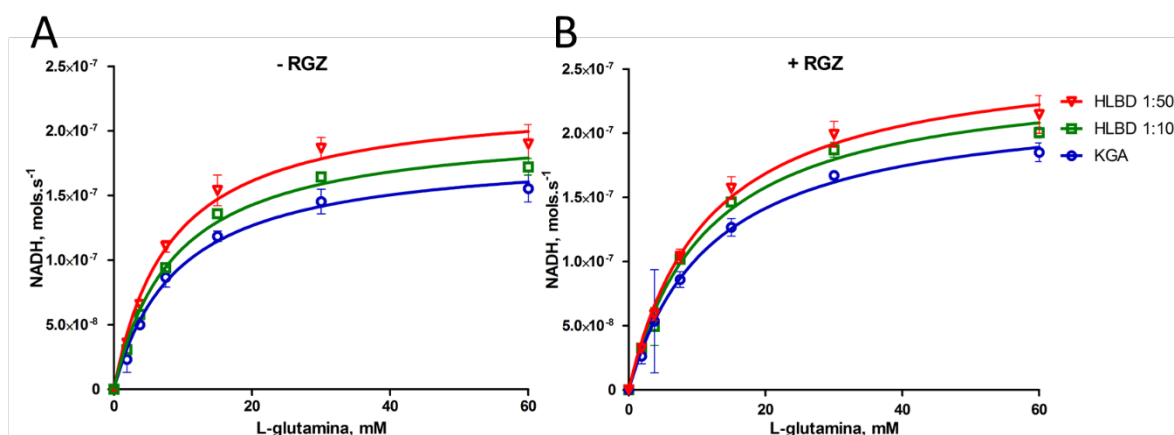


Figura 37. Curvas de Michaelis-Menten obtidas para KGA na ausência e na presença de PPAR γ *hinge*-LBD em excesso molar de 10 e 50x em relação à enzima. O ensaio foi realizado na ausência de RGZ (**A**) e na presença de RGZ a 500 μ M (**B**). Para a realização do ensaio, 10 nM da enzima, 3 unidades de GDH, 2 mM de NAD e 20 mM de P_i foram incubados com concentrações crescentes de L-glutamina. A formação de NADH foi monitorada por absorvância a 340 nm. As velocidades iniciais foram plotadas em função da concentração de glutamina e ajustadas usando GraphPad Prism 5.0.

A presença de PPAR γ provocou um aumento discreto no valor de $K_{cat-app}$ e uma pequena diminuição no valor de K_{M-app} , fazendo com que a eficiência catalítica (K_{cat}/K_M) fosse aumentada, de 2 para 2,3 com excesso molar de 10X, e para 2,8 com PPAR γ 50X mais concentrado em relação à KGA (Tabela 11). Na presença de RGZ, também foi observado um aumento, porém menos significativo, na eficiência catalítica de KGA quando incubada com PPAR γ (Tabela 12).

Tabela 11. Valores de K_{cat} , K_M e V_{max} aparentes obtidos nos ensaios de cinética de KGA (10 nM) isolada ou na presença de PPAR γ *hinge*-LBD em diferentes concentrações, após incubação por uma hora a 4°C.

	KGA	KGA + LBD (1:10)	KGA + LBD (1:50)
$K_{cat-app}$ (s^{-1})	$18,5 \pm 0,6$	$20,5 \pm 0,4$	$22,7 \pm 0,7$
K_{M-app} (mM)	$9,2 \pm 0,9$	$8,8 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,8$
Eficiência catalítica (K_{cat}/K_M)	$2,01 \pm 0,21$	$2,33 \pm 0,17$	$2,80 \pm 0,29$
$V_{max-app}$	$1,85e^{-7}$	$2,05e^{-7}$	$2,27e^{-7}$
R^2	0,982	0,992	0,982

Tabela 12. Valores de K_{cat} , K_M e V_{max} aparentes obtidos nos ensaios de cinética de KGA (10 nM) isolada ou na presença de PPAR γ hinge-LBD e RGZ (500 μ M) em diferentes concentrações, após incubação por uma hora a 4°C.

	KGA	KGA + LBD (1:10)	KGA + LBD (1:50)
$K_{cat-app}$ (s^{-1})	$22,7 \pm 1,3$	$24,8 \pm 0,8$	$27,6 \pm 1,0$
K_{m-app} (mM)	$12,1 \pm 1,9$	$11,3 \pm 1,0$	$10,1 \pm 1,0$
Eficiência catalítica (K_{cat}/K_M , $mM^{-1}.s^{-1}$)	$1,88 \pm 0,32$	$2,18 \pm 0,21$	$2,33 \pm 0,22$
$V_{max-app}$	$2,27e^{-7}$	$2,48e^{-7}$	$2,64e^{-7}$
R^2	0,959	0,986	0,987

5.6.3. Ensaios de luciferase

Com o intuito de avaliar o efeito de KGA sobre a atividade de PPAR γ , optamos pela realização do ensaio de gene repórter de luciferase. Como ponto de partida, empregamos a linhagem celular HEK-293T, derivada de rim embrionário humano, devido à sua alta eficiência de transfecção. O agonista de PPAR γ , RGZ, foi empregado no tratamento das células com o intuito de elevar os níveis de transativação.

O ensaio inicial, em placa de 24 poços, resultou em uma redução de 51% na atividade transcricional de PPAR γ na presença de KGA e RGZ. Na ausência de RGZ, KGA promoveu uma redução menor, de 35%, na atividade de PPAR γ sobre o gene repórter (Figura 38).

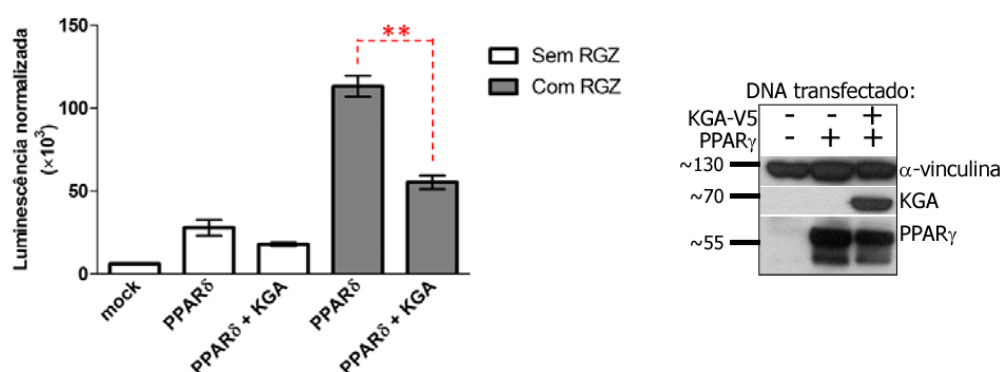


Figura 38. Ensaio de gene repórter de luciferase para avaliar o efeito de KGA na atividade transcricional de PPAR γ . Células HEK-293T foram co-transfectadas de forma transiente com PPAR γ , KGA, plasmídeo experimental 3 \times PPRE-luciferase e controle de *Renilla*. 12 horas após a transfecção, as células foram tratadas com RGZ (1 μ M) e cultivadas por 24 horas. A atividade de luciferase de vagalume foi detectada utilizando o sistema DLR (Promega). Os valores de luminescência de luciferase de vagalume foram normalizados em relação aos de *Renilla*. ** $p < 0,01$; $n = 3$.

O ensaio de gene repórter de luciferase foi repetido em placa de 96 poços, empregando, além de HEK-293T, uma segunda linhagem, neste caso, proveniente de

tumor de mama: MDA-MB-436. O objetivo foi validar os resultados obtidos em HEK-293T e avaliar o efeito de KGA na atividade de PPAR γ em um contexto metabólico tumoral. Foi observado que KGA diminuiu a capacidade de transativação de PPAR γ em ambas as linhagens. Em HEK-293T, houve uma queda de 32% na atividade do receptor ativado por RGZ e 25% de queda na ausência do agonista. Por sua vez, em MDA-MB-436, a queda na atividade de PPAR γ induzida por KGA só se mostrou significativa na presença de RGZ, correspondendo a 17,5% de redução nos sinais de luminescência. A ausência de RGZ promoveu diminuição de cerca de 11% sobre a média, porém com sobreposição das barras de erro (Figura 39).

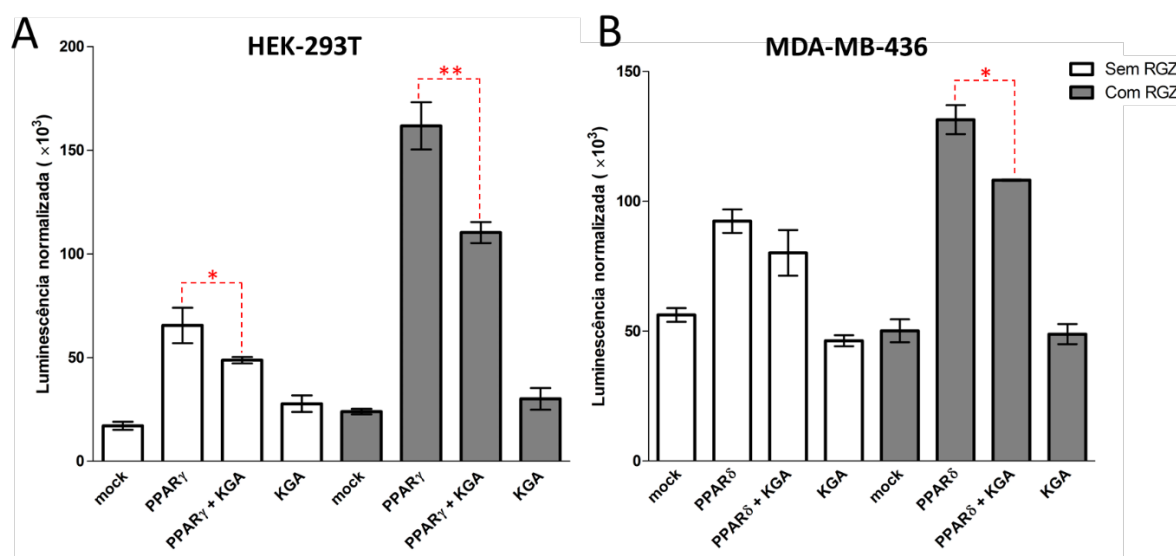


Figura 39. Ensaio de gene repórter de luciferase para avaliar o efeito de KGA na atividade transcricional de PPAR γ nas linhagens HEK-293T (A) e MDA-MB-436 (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3$. Células HEK-293T e MDA-MB-436 foram co-transfectadas de forma transiente com PPAR γ , KGA, plasmídeo experimental 3 \times PPRE-luciferase e plasmídeo controle de Renilla. 12 horas após a transfecção, as células foram tratadas com RGZ (1 μ M) e cultivadas por 24 horas. A atividade de luciferase de vagalume foi detectada utilizando o sistema DLR (Promega). Os valores de luminescência de luciferase de vagalume foram normalizados em relação aos de Renilla.

6. DISCUSSÃO

O genoma humano tem duas cópias de genes que codificam para glutaminases, os quais são conhecidos por produzir pelo menos quatro isoformas por *splicing* alternativo ou por transcrição em sítios de iniciação alternativos (Altman, Stine, & Dang 2016). Modelos evolutivos genéticos frequentemente predizem um aumento no número de cópias de um gene anterior à especialização ou ganho de novas funções, compreendido por um estágio intermediário e momentâneo no qual as funções se sobrepõem (Bergthorsson, Andersson, & Roth 2007).

A aparente redundância no número de isoformas de glutaminases pode ser explicada por processos de regulação enzimática distintos e por padrões de expressão específicos, dependentes do tipo de célula e do estágio do ciclo em que se encontram (quiescente ou proliferativo). Neste sentido, KGA é expressa em células do túbulo epitelial de rim, no qual a produção de amônia é chave para a regulação ácido-base renal (Curthoys et al. 1976); LGA é expressa em hepatócitos periportais, onde participa da síntese de ureia (Curthoys & Watford 1995). Ademais, enquanto GAC é responsável por atender as demandas metabólicas dependentes de Gln de diversos tipos de câncer, GAB mostrou ter atividade supressora de tumor em hepatocarcinomas e gliomas (Zhang et al. 2016).

Apesar da diversidade funcional, as isoformas de glutaminases humanas convergem para uma estrutura multidomínio conservada. Com base em uma combinação de predições computacionais e evidência experimental, principalmente produzida por análises de cristalografia de raios-X, descobrimos que todas as quatro isoformas contém um domínio N-terminal *EF-hand-like*, seguido de um domínio glutaminase na porção central e três repetições ANK no C-terminal. A única exceção é GAC, cujo C-terminal envolve uma região curta e provavelmente desestruturada, incorporado por *splicing* alternativo do gene *GLS*.

Neste trabalho, a arquitetura multidomínios mostrou ser compartilhada por todos os cordados, incluindo peixes, reptéis, aves e anfíbios, assim como por artrópodes e nematódeos. A partir de um levantamento das sequências proteicas de glutaminases depositadas em bancos de dados, observamos características organizacionais similares em proteo- e cianobactérias de vida livre, porém não em fungos. Com base em nossas análises, propomos uma origem bastante remota para

a estrutura multidomínios das glutaminases. Além do mais, verificamos que a multiplicidade gênica ocorre em uma ampla variedade de vertebrados. Por análise adicional dos genomas de espécies representativas do filo *Cordata*, fomos capazes de identificar eventos primitivos de reposicionamento de éxons entre tunicados e cefalocordados, seguido de duplicação gênica em *Hyperoartia* e retrotransposição de éxon em *Condrictes*, concomitante com a mudança de uma estrutura renal simples de pronefros para outra mais complexa composta por mesonefros (Scott 1987). Juntas, todas estas características são provavelmente a base da diversidade de isoenzimas observada em vertebrados. Também reconstruímos um gene ancestral de glutaminase mais similar à glutaminase *kidney-type* humana e que deu origem à glutaminase *liver-type*, enquanto que o aparecimento de glutaminase *GAC-like*, com C-terminais mais curtos, ocorreu tardiamente na evolução de glutaminases.

GAC é a isoforma de glutaminase mais ativa, quando comparada com KGA e LGA, uma característica correlacionada à sua capacidade de se organizar em superoligômeros filamentosos longos. No presente estudo, descobrimos que esta característica é possível somente porque GAC não contem o C-terminal primitivo e volumoso composto por repetições ANK de KGA, já que a construção ΔC se organiza em filamentos maiores e é ainda mais ativa do que GAC. Portanto, nós propomos que a capacidade de polimerização é uma característica de ganho de função de glutaminases de vertebrados, a qual foi positivamente selecionada resultando na geração uma enzima mais ativa devido ao efeito de canalização de substrato.

A nova estrutura de KGA humana contendo o domínio ANK apresentada neste trabalho confirma, mesmo que em baixa resolução, nossa hipótese inicial de que a propagação de filamentos desta isoforma era prejudicada pela presença das repetições ANK (Ferreira et al. 2013). Conforme observado no modelo cristalográfico, o dímero ANK oclui a formação do sulco de filamentação, através do qual um filamento de fita única da isoforma GAC cresce de forma indefinida, via interação ponta a ponta entre pares de domínios N-terminais. Como GAC possui uma sequência C-terminal mais curta e desestruturada, esta hipótese é confirmada quando o domínio ANK foi completamente deletado na construção mutante ΔC , capaz de formar espécies poliméricas ainda mais longas, resultando assim em uma enzima mais ativa.

Nosso grupo e outros publicaram anteriormente a estrutura dos domínios N-terminal *EF-hand-like* e glutaminase de GLS (Cassago et al. 2012; DeLaBarre et al.

2011), sendo que a estrutura do domínio ANK C-terminal ainda não havia sido resolvida. Neste trabalho, fornecemos a estrutura cristalográfica inédita do domínio ANK de glutaminase, que surpreendentemente se organiza em um dímero atípico. Repetições ANK geralmente medeiam a interação de uma proteína com outras proteínas parceiras principalmente através do chamado ANK *groove*. Entretanto, em glutaminases, esta mesma superfície côncava atua como mediadora da formação de homo-dímeros, uma característica rara para esse tipo de domínio.

A interface homodimérica envolve principalmente contatos entre os motivos DYD e DRW localizados nos β -*hairpins* 1 e 2. Curiosamente, observamos que, apesar da identidade sequencial relativamente baixa entre as repetições ANK de glutaminases eucarióticas, os motivos DYD e DRW são regiões altamente conservadas. Do mesmo modo, os homólogos de glutaminases bacterianas que apresentam o domínio ANK tem o maior grau de conservação nas mesmas regiões DYD e DRW, além de algumas outras posições conservadas espalhadas, novamente sugerindo uma relação evolucionária para esta proteína ao longo dos domínios da vida.

Uma pesquisa no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*, www.rcsb.org) resultou na identificação de mais de 68 estruturas cristalográficas únicas de proteínas não-sintéticas contendo repetições ANK. Tais estruturas apresentam grande variedade em termos de números de repetições, entre 2 até 24 (Tabela 13). Destas, somente 5 estruturas apresentam uma associação clara entre domínios ANK resultando na formação de um estado homo-oligomérico (Figura 40). Entretanto, em nenhuma delas foi observada uma interface semelhante ao do dímero formado pelos domínios ANK de glutaminases (contatos entre motivos DYD e DRW). Portanto, propomos que a associação dimérica de ANK aqui descrita seja estruturalmente exclusiva de glutaminases, sendo selecionada como uma característica conservada ao longo de sua evolução. Uma explicação plausível para esta seleção positiva permanece indefinida.

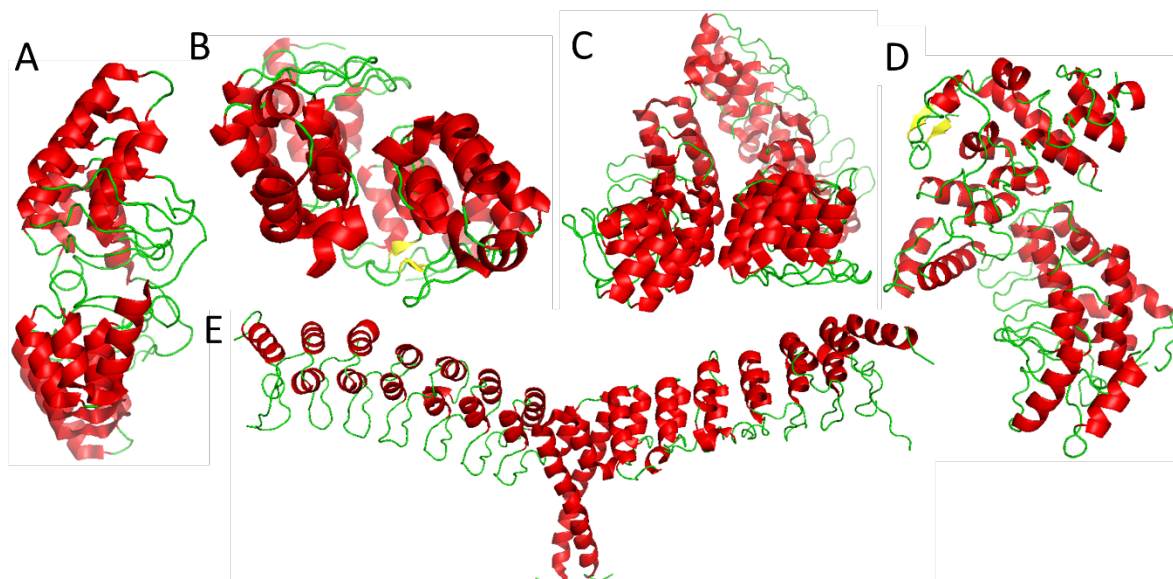


Figura 40. Estruturas de proteínas que apresentam associação entre repetições ANK, resultando na formação de estados homo-oligoméricos. (A) *Ankyrin repeat cluster* (ARC4) de *Tankyrase 2* humana (PDB 3TWQ); (B) proteína funcionalmente desconhecida de *Leptotrichia buccalis* (PDB 3T8K); (C) domínio ANK de *Huntingtin interacting protein 14* (PDB 3EU9); (D) fragmento contendo repetições ANK do regulador de ciclo celular de levedura Swi6 (PDB 1SW6); (E) domínio C-terminal de p100/NF- κ B2 (PDB 4OT9).

Tabela 13. Levantamento de estruturas cristalográficas representativas contendo Repetições ANK e que estão depositadas no PDB.

Proteína contendo repetições ANK	Organismo	PDB ID	Conjunto biológico	Número de repetições ANK*
2-5A-dependent ribonuclease	<i>Homo sapiens</i>	4oav	homo-2-mero	9
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	<i>Homo sapiens</i>	1qym	monômero	7
ABAYE2397	<i>Acinetobacter baumannii</i>	5d66	monômero	6
Ankyrin repeat and SOCS box protein 11	<i>Homo sapiens</i>	4uuc	monômero	6
Ankyrin repeat and SOCS box protein 9	<i>Homo sapiens</i>	3d9h	monômero	7
Ankyrin repeat domain-containing protein 27	<i>Homo sapiens</i>	4cym	hetero-4-mero	5
Ankyrin repeat domain-containing protein 2A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4tum	monômero	4
Ankyrin repeat family A protein 2	<i>Homo sapiens</i>	3so8	monômero	5
Ankyrin repeat family protein	<i>Legionella pneumophila</i>	2aja	monômero	10
Ankyrin repeat-containing protein	<i>Legionella pneumophila</i>	4zhh	monômero	3
Ankyrin repeat-containing protein YAR1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4bsz	hetero-8-mero	4
Ankyrin-1	<i>Homo sapiens</i>	1n11	monômero	12
Ankyrin-2, Ankyrin-1	<i>Homo sapiens</i> / <i>Mus musculus</i> (quimera)	4rlv	monômero	24
Anti-ige inhibitor e2_79	<i>Escherichia coli</i>	4grg	hetero-4-mero	4
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	<i>Homo Sapiens</i>	1ycs	hetero-2-mero	4
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	<i>Homo sapiens</i>	3jue	monômero	4

Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	<i>Mus musculus</i>	1dcq	monômero	3
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 3	<i>Homo Sapiens</i>	2b0o	homo-2-mero	4
B-cell lymphoma 3 protein	<i>Homo sapiens</i>	1k1a	monômero	7
Bd3460	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	5cea	monômero	6
BRCA1-associated RING domain protein 1	<i>Homo sapiens</i>	3c5r	monômero	4
Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D	<i>Homo sapiens</i>	1bd8	monômero	5
Cyclin-dependent kinase 6 inhibitor	<i>Homo sapiens</i>	1mx2	monômero	5
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	<i>Homo Sapiens</i>	1bi7	hetero-4-mero	4
DNA-binding protein RFXANK	<i>Homo sapiens</i>	3uxg	monômero	5
EF_0377	<i>Enterococcus faecalis</i>	3hra	monômero	6
Eukaryotic huntingtin interacting protein B	<i>Legionella pneumophila</i>	5czy	monômero	5
GA-binding protein subunit beta-1	<i>Mus musculus</i>	1awc	hetero-2-mero	5
Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1	<i>Homo sapiens</i>	3b7b	monômero	7
Integrin-linked protein kinase	<i>Homo sapiens</i>	3f6q	hetero-2-mero	5
K1L	<i>Vaccinia virus</i>	3kea	monômero	9
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	<i>Homo sapiens</i>	4hbd	monômero	6
Krev interaction trapped protein 1	<i>Homo sapiens</i>	5d68	monômero	4
LMJF_29_1100	<i>Leishmania major</i>	3ljn	monômero	8
Methionyl-tRNA formyltransferase	<i>Providencia alcalifaciens</i>	4xcz	homo-2-mero	4
Myotrophin	<i>Homo sapiens</i>	3aaa	hetero-2-mero	3
Neurogenic locus notch homolog protein 1	<i>Mus musculus</i>	1ymp	monômero	4
Neurogenic locus notch homolog protein 1	<i>Homo Sapiens</i>	1yyh	monômero	6
Neurogenic locus Notch protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	1ot8	monômero	6
NF-kappa-B inhibitor alpha	<i>Homo Sapiens</i>	1ikn	hetero-3-mero	6
NF-kappa-B inhibitor beta	<i>Mus musculus</i>	1k3z	hetero-3-mero	6
Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	<i>Homo sapiens</i>	4ot9	homo-2-mero	7
Osteoclast-stimulating factor 1	<i>Homo sapiens</i>	3ehq	monômero	4
Palmitoyltransferase ZDHHC17	<i>Homo sapiens</i>	3eu9	homo-6-mero	7
Phosphocholine transferase AnkX	<i>Legionella pneumophila</i>	4ber	monômero	4
Probable 26S proteasome regulatory subunit p28	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1ixv	monômero	7
Protein lin-12	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2fo1	hetero-3-mero	8
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	<i>Gallus gallus</i>	1s70	hetero-2-mero	7
Putative ankyrin repeat protein TV1425	<i>Thermoplasma volcanium</i>	2rfm	monômero	6
Regulatory protein SWI6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1sw6	homo-2-mero	5
RelA-associated inhibitor	<i>Homo Sapiens</i>	2vge	monômero	4
Ribonuclease L	<i>Sus scrofa</i>	4o1o	homo-2-mero	9
Signal recognition particle 43 kDa protein, chloroplastic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3deo	monômero	4

Tankyrase-1	<i>Mus musculus</i>	3utm	hetero-3- mero	9
Tankyrase-2	<i>Homo sapiens</i>	3twr	monômero	5
Tankyrase-2	<i>Homo sapiens</i>	3twq	homo-2- mero	5
Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1, Maltose-binding periplasmic protein chimera	<i>Homo sapiens</i> <i>Escherichia coli</i> (quimera)	3j9p	homo-4- mero	5
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	<i>Rattus norvegicus</i>	3j5p	homo-4- mero	6
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	<i>Homo Sapiens</i>	2f37	monômero	6
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	<i>Rattus norvegicus</i>	2eta	monômero	6
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 3	<i>Mus musculus</i>	4n5q	monômero	6
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4	<i>Homo Sapiens</i>	4dx1	monômero	6
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6	<i>Mus musculus</i>	2rfa	monômero	6
TRPV2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	5an8	homo-4- mero	5
Ubiquitin thioesterase ZRANB1	<i>Homo Sapiens</i>	3zrh	monômero	2
uncharacterized protein	<i>Leptotrichia buccalis</i>	3t8k	homo-2- mero	5
Vanilloid receptor-related osmotically activated channel protein	<i>Gallus gallus</i>	3jxi	monômero	6

* Corresponde somente ao número de repetições ANK presentes na estrutura cristalográfica indicada, não correspondendo a quantidade total de repetições presentes na proteína em questão.

As regiões curtas localizadas imediatamente após o domínio ANK em KGA e GLS2 (respectivos motivos KEN e ESMV) estão respectivamente envolvidas em degradação dependente de E3 ubiquitina ligase (Colombo et al. 2010) e na mediação de interações com proteínas contendo domínio PDZ (Lucía Olalla et al. 2008). Uma análise de complexos proteicos envolvendo proteínas que contem ANK e seus respectivos parceiros de interação (Russo et al. 1998; Chiswell et al. 2008; Takeda et al. 2010; Holzer, Ban, & Klinge 2013) mostraram que a maior parte dos contatos necessários para a interação ANK-ANK envolvem o chamado ANK *groove* (a superfície côncava). Embora a maioria dos casos conhecidos envolverem a superfície côncava, foram reportados contatos proteína-proteína através da face convexa. Um exemplo é a oncoproteína humana *g-ankyrin*, a qual foi cristalizada em complexo com um fragmento de anticorpo (Figura 41A). Nesta estrutura, a interação ocorreu através das α -hélices externas das repetições ANK4 a ANK6 (Robin et al. 2014). Por sua vez, a proteína VARP (*VPS9-domain ankyrin repeat*) se liga a Rab32 através do lado convexo de seu primeiro domínio ANK (Figura 41B, Hesketh et al. 2014). A proteína

K1 de vaccínia vírus consiste inteiramente de repetições ANK que parecem estar envolvidas em interações mediadas pela superfície convexa (Y. Li et al. 2010).

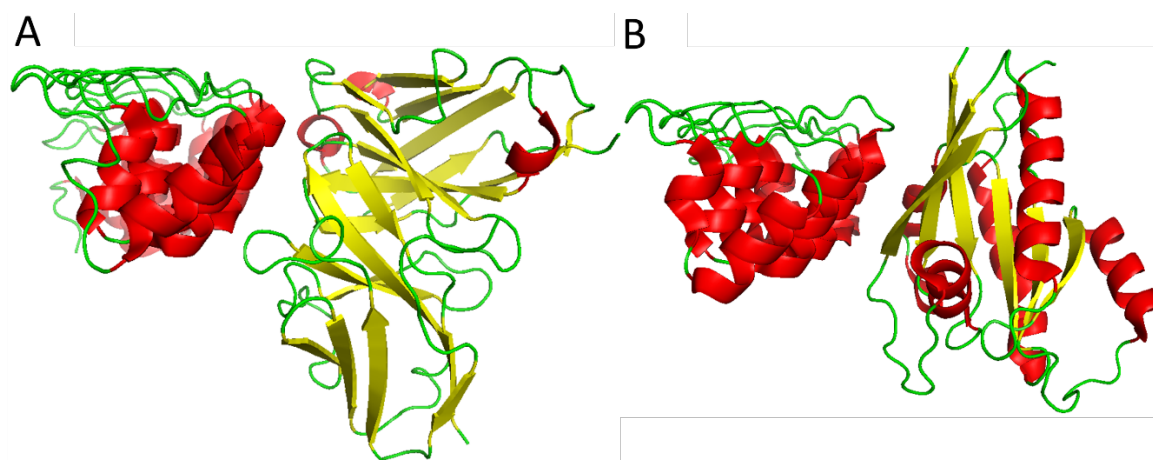


Figura 41. Exemplos de complexos envolvendo proteínas ANK que fazem interações com outras proteínas através da superfície convexa, oposta ao ANK *groove*. **(A)** *Gankyrin* humana em complexo com fragmento de anticorpo (PDB 4NIK); **(B)** primeiro domínio ANK de VARP em complexo com Rab32 (PDB 4CYM).

Nesse sentido, embora as faces côncavas das repetições ANK de glutaminases realizem contatos dentro da própria proteína, estima-se que as repetições ANK ainda possam mediar interações proteína-proteína através de sua superfície convexa. Estudos recentes mostraram que GAB se liga a *small* GTPase Rac1 e a inibe ao impedir sua interação com GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*), interação esta que envolve o C-terminal de GLS2 (resíduos 464 a 602) (Zhang et al. 2016). Como esta região contém as repetições ANK de GAB, é possível que este contato envolva a superfície convexa de ANK. Com base em uma longa lista de parceiros que se mostraram interagir com glutaminases identificados através de abordagens baseadas em espectrometria de massas (Huttlin et al. 2015; Ewing et al. 2007), novos estudos se fazem necessários para confirmar o mecanismo pelo qual as repetições ANK de glutaminases poderiam mediar interações proteína-proteína.

Além do domínio ANK, as glutaminases apresentam outras regiões conhecidas de interação com outras proteínas. Por exemplo, os motivos LXXLL, também chamados de *NR box*, estão presentes tanto nas isoformas GLS quanto GLS2. Nosso grupo identificou o receptor nuclear PPAR γ como parceiro de interação de KGA através de ensaios de duplo híbrido em levedura. Utilizando esta mesma abordagem, identificamos o envolvimento do primeiro motivo LXXLL (10-LRDLL-14) na interação.

Com base na relevância metabólica de PPAR γ , este trabalho buscou caracterizar a sua interação com KGA utilizando abordagens bioquímicas e funcionais. A avaliação do efeito de PPAR γ na atividade enzimática de KGA foi verificada a partir de ensaios cinéticos envolvendo as proteínas obtidas de forma recombinante. Foi observado que PPAR γ interferiu ligeiramente nos parâmetros cinéticos: os valores de $K_{cat-app}$ se elevaram enquanto o K_M foi reduzido com o aumento da concentração de PPAR γ . Consequentemente, a eficiência catalítica (K_{cat}/K_M) da enzima aumentou de $2,01 \pm 0,21$ para $2,33 \pm 0,17 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ com 100 nM de PPAR γ e para $2,80 \pm 0,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ com 500 nM de PPAR γ . Efeito semelhante foi observado na presença do agonista RGZ. Devemos considerar que, mesmo em excesso molar de 50X, as concentrações de PPAR γ testadas ainda estão bem abaixo do K_d aparente da interação ($21,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$), medido através dos ensaios de anisotropia de fluorescência. Portanto, espera-se que, na presença de concentrações mais elevadas de PPAR γ , seja observado um efeito mais evidente sobre a atividade enzimática de KGA.

Através dos ensaios de anisotropia, foi demonstrado que a construção envolvendo o LBD é suficiente para mediar a interação com KGA, corroborando com os resultados de duplo híbrido obtidos em nosso grupo. A construção de PPAR γ *hinge*-LBD resultou em valores de K_{d-app} muito próximos aos obtidos para a construção mais completa contendo DBD e LBD. Por outro lado, a construção que envolve o N-terminal e o domínio catalítico de KGA, ΔC , se mostrou suficiente na interação, condizendo com o dado de duplo híbrido que indicou a porção N-terminal como domínio mínimo para a interação. A construção de KGA contendo apenas o domínio N-terminal não pôde ser testada, devido a dificuldades na obtenção da proteína expressa de maneira recombinante (dados não apresentados). Devemos ressaltar que as construções de glutaminases produzidas de forma recombinante apresentam uma deleção na porção N-terminal correspondente à região processada juntamente com o sinal de localização mitocondrial da proteína nativa. Esta região contém o primeiro *NR box* (resíduos 10 a 14), que foi identificado por ensaios de duplo híbrido como importante para a interação com PPAR γ . Contudo, observamos neste trabalho que a ausência deste motivo não anulou a interação entre as proteínas recombinantes.

Embora ΔC tenha demonstrado afinidade comparável por PPAR γ , o K_{d-app} da construção mais completa de KGA incluindo o C-terminal foi cerca de 43% menor. Questionamos se esta maior afinidade está relacionada com uma menor capacidade

de se polimerizar, se comparada com a construção ΔC . Deste modo, empregamos o P_i com o intuito de avaliar a possível interferência da formação de oligômeros maiores na interação. De fato, a presença dele promoveu um aumento de mais de 60% no K_{d-app} tanto de KGA quanto da construção ΔC . Estes dados sugerem que a formação de superoligômeros possa, de fato, interferir negativamente na afinidade por PPAR γ .

Ao testar a afinidade da isoforma GAC por PPAR γ *hinge*-LBD utilizando a metodologia de anisotropia de fluorescência, obtivemos K_{d-app} muito próximo ao de KGA, evidenciando, mais uma vez, a baixa ou nenhuma influência das regiões C-terminal de ambas para a interação. Porém, ao incluir ligantes de PPAR γ , RGZ e GW9662, obtivemos resultados distintos para ambas glutaminases. Tanto o agonista quanto o antagonista foram responsáveis por diminuir a afinidade das duas glutaminases por PPAR γ , entretanto este efeito foi mais acentuado em GAC.

Através da abordagem celular, envolvendo a metodologia do ensaio de gene repórter, observamos que a superexpressão de KGA promoveu uma diminuição na atividade transcricional de PPAR γ em células normais (HEK-293T) e tumorais (MDA-MB-436). Estes dados, por si só, não são indicativos de uma interação direta entre as duas proteínas, já que a superexpressão de KGA poderia resultar em possíveis alterações metabólicas, que, por sua vez, afetariam a atividade de PPAR γ . Entretanto, como estamos investigando a ocorrência de uma interação direta entre as duas proteínas, podemos considerar duas hipóteses: (a) KGA atua como co-repressora de PPAR γ no núcleo; (b) KGA sequestra PPAR γ em outro compartimento celular, impossibilitando sua atividade genômica. A primeira hipótese implica em translocação da enzima para o núcleo. Até o momento, ocorrências de localização nuclear não foram reportadas para KGA. Por sua vez, a isoforma GLS2 (GAB/LGA) já foi detectada no núcleo de células do sistema nervoso central, como neurônios (Olalla et al. 2002) e astrócitos (Cardona et al. 2015), além de sua ocorrência no núcleo de células de inseto Sf9 após transfectadas com o plasmídeo recombinante contendo a sequência codificante de LGA humana (Campos-Sandoval et al. 2007). Enquanto as glutaminases apresentam determinantes estruturais necessárias para o direcionamento mitocondrial, não existem evidências de sinais de localização nuclear putativos. Portanto, o mecanismo pelo qual estas enzimas possam ser direcionadas para o núcleo permanece obscuro. Por sua vez, a translocação nuclear de uma enzima mitocondrial contendo sinal mitocondrial, mas sem um sinal específico de

importe nuclear, não ocorreria sem precedentes. 3-hidroxi-3metilglutarilCoA sintase mitocondrial (mHMG-CoAS) foi detectada no núcleo e sua translocação nuclear parece envolver interação com o receptor nuclear PPAR α mediada por motivo LXXLL (Meertens et al. 1998). Portanto, esta seria uma suposição plausível para o importe nuclear de glutaminases, considerando a presença dos motivos do tipo *NR box* no N-terminal de todas as quatro isoformas descritas.

Sabe-se que os motivos do tipo *NR box* são tradicionalmente conhecidos por mediar a interação de coativadores com receptores nucleares, enquanto os co-repressores se valem dos chamados CoRNR box. Entretanto, foram identificados co-repressores capazes de interagir com receptores nucleares através de motivos LXXLL (Augereau et al. 2006; White et al. 2004). Deste modo, ainda considerando a hipótese da função co-repressora de KGA, é possível que a interação ocorra através dos motivos LXXLL e ainda assim resulte em um efeito inibitório sobre a atividade transcricional de PPAR γ .

A segunda hipótese, envolvendo o sequestro de PPAR γ em outro compartimento celular que não o núcleo por KGA é possível, considerando que o PPAR γ pode sofrer exporte nuclear em condições específicas (Burgermeister et al. 2007; Burgermeister and Seger 2007). Ensaios de fracionamento celular realizados em nosso grupo identificaram PPAR γ na mitocôndria (Cassago 2016). Resultados de imunofluorescência recentemente obtidos pela Dr^a. Marília M. Dias, pós-doutoranda do nosso grupo, confirmaram a co-localização de PPAR γ e GLS na mitocôndria. Ao investigar a presença de PPAR γ na mitocôndria, Casas et al. (2000) identificou uma proteína de 45 kDa imunologicamente relacionada com a isoforma 2 de PPAR γ na matriz mitocondrial de fígado de rato com possível função na regulação da expressão gênica do DNA mitocondrial. Por sua vez, a regulação da função mitocondrial através da translocação de receptores nucleares e fatores de transcrição pode representar um dos possíveis mecanismos de comunicação cruzada entre mitocôndria e o núcleo (Lee et al. 2008).

Embora haja poucos registros na literatura sobre a localização mitocondrial de PPAR γ , sua localização citosólica já foi reportada diversas vezes, como consequência de diferentes mecanismos celulares. Em resposta a estímulo mitogênico, PPAR γ em complexo com MEK1 migrou para fora do núcleo através de transporte ativo mediado por CRM1 (*Chromosomal Maintenance* 1, também

conhecido como exportina 1), inibindo, assim, a transativação dependente de PPAR γ no núcleo (Burgermeister et al. 2007). Um mecanismo anti-inflamatório único, ativado por bactérias intestinais, foi descrito, no qual PPAR γ se liga um membro da família NF- κ B no núcleo e é transportado pelo citosol de forma independente de CRM1 (Kelly et al. 2004). Foi identificado que PPAR γ sequestra PKC α (proteína quinase C alfa) no citoplasma através de uma interação direta, reduzindo, assim, a sinalização pró-inflamatória em macrófagos (Von Knethen et al. 2010; Von Knethen et al. 2007).

Apesar das nossas evidências de co-localização na mitocôndria, não podemos descartar também a possibilidade de PPAR γ interagir com KGA no citosol. Se confirmado, este não seria o primeiro caso descrito de interação da glutaminase com outra proteína no citoplasma celular. Foi reportado que BMCC1s [*Bcl2-adenovirus E1B nineteen kDa-interacting protein 2 (BNIP-2) and Cdc42GAP homology BCH motif-containing molecule at the carboxyl terminal region 1*] parece interagir preferencialmente com o precursor citosólico de KGA, de 74 kDa, monomérico e inativo, impedindo que este alcance a mitocôndria e seja processado para a sua forma madura e cataliticamente ativa (Boulay et al. 2013). Considerando que o precursor de KGA possui o primeiro LXXLL, a hipótese de sua interação com PPAR γ é compatível com o resultado de duplo híbrido que indicou este motivo como essencial para a interação.

7. CONCLUSÃO

Com base nas análises filogenéticas, concluímos que a arquitetura multidomínios das glutaminases é uma característica herdada de ancestrais bacterianos.

A partir da árvore filogenética construída, propusemos um modelo evolutivo no qual um gene antecessor *GLS-like* em tunicados deu origem às isoenzimas humanas existentes atualmente a partir de eventos de remodelamento de éxon, duplicação gênica e retrotransposição.

A isoforma mais ativa, GAC, resultou de um evento tardio de retrotransposição de éxons, ocorrido em peixes pertencentes a classe dos condrites.

O domínio ANK foi adquirido por glutaminases nos primórdios do processo evolutivo, estando presente ao longo de toda a sua evolução.

A estrutura cristalográfica obtida para o domínio ANK de KGA revelou a formação de um dímero exclusivo e com interfaces conservadas desde bactérias.

Os contatos homodiméricos do domínio ANK são estabelecidos principalmente por dois motivos de três resíduos altamente conservados em bactérias e eucariotos.

Determinamos a estrutura cristalográfica de KGA humana contendo os três domínios, N-terminal, catalítico e C-terminal envolvendo os Repetições ANK. Propusemos que a presença do C-terminal volumoso diminui a capacidade de polimerização de KGA por impedimento estérico, tornando-a menos ativa do que GAC.

O domínio LBD de PPAR γ e os domínios N-terminal e catalítico de KGA foram suficientes para a interação entre as proteínas obtidas de forma recombinante.

A diminuição da afinidade da interação de KGA por PPAR γ na presença de fosfato e a menor afinidade pelo receptor apresentada pela construção ΔC mesmo na ausência de fosfato nos levou a sugerir que a polimerização das glutaminases possa prejudicar a interação entre glutaminases e o receptor.

GAC obtida de forma recombinante também mostrou interação com PPAR γ com afinidade semelhante à KGA.

KGA interagiu com PPAR γ com afinidade relativamente baixa, com K_{d-app} da ordem de micromolar, indicativo de uma interação fraca e transiente.

Os ligantes de PPAR γ RGZ (agonista) e GW-9662 (antagonista) diminuíram a afinidade da interação do receptor com KGA e GAC.

A superexpressão de KGA resultou em aumento na atividade transcricional de PPAR γ sobre o gene rep rt r, tanto em célula não tumoral (HEK-293T) quanto tumoral (MDA-MB-436).

Coletivamente, estes resultados contribuem para o entendimento das diferenças entre as múltiplas glutaminases de mamíferos, podendo auxiliar no desenho de inibidores isoforma-específicos para ao tratamento do câncer e de outras doenças.

8. REFERÊNCIAS

- Aledo, J. Carlos, Pedro M. Gómez-Fabre, Lucía Olalla, and Javier Márquez. 2000. "Identification of Two Human Glutaminase Loci and Tissue-Specific Expression of the Two Related Genes." *Mammalian Genome* 11 (12): 1107–10. doi:10.1007/s003350010190.
- Altman, Brian J, Zachary E Stine, and Chi V Dang. 2016. "From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 16 (10). Nature Publishing Group: 619–34. doi:10.1038/nrc.2016.71.
- Augereau, Patrick, Eric Badia, Patrick Balaguer, Sophie Carascossa, Audrey Castet, Stéphan Jalaguier, and Vincent Cavaillès. 2006. "Negative Regulation of Hormone Signaling by RIP140." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1–5 SPEC. ISS.): 51–59. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.005.
- Batchelor, A H, D E Piper, F C de la Brousse, S L McKnight, and C Wolberger. 1998. "The Structure of GABPalpha/beta: An ETS Domain- Ankyrin Repeat Heterodimer Bound to DNA." *Science (New York, N.Y.)* 279 (1998): 1037–41. doi:10.1126/science.279.5353.1037.
- Bergström, J, P Fürst, L O Norée, and E Vinnars. 1974. "Intracellular Free Amino Acid Concentration in Human Muscle Tissue." *Journal of Applied Physiology* 36 (6): 693–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4829908>.
- Bergthorsson, Ulfar, Dan I Andersson, and John R Roth. 2007. "Ohno's Dilemma: Evolution of New Genes under Continuous Selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (43): 17004–9. doi:10.1073/pnas.0707158104.
- Boulay, Anne Cécile, Silvia Burbassi, Hans Kristian Lorenzo, Damarys Loew, Pascal Ezan, Christian Giaume, and Martine Cohen-Salmon. 2013. "Bmcc1s Interacts with the Phosphate-Activated Glutaminase in the Brain." *Biochimie* 95 (4). Elsevier Masson SAS: 799–807. doi:10.1016/j.biochi.2012.11.016.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr. 1995. "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16): 7297–7301. doi:10.1073/pnas.92.16.7297.
- Bramlett, K S, Y Wu, and T P Burris. 2001. "Ligands Specify Coactivator Nuclear Receptor (NR) Box Affinity for Estrogen Receptor Subtypes." *Mol Endocrinol* 15 (6): 909–22. doi:10.1210/mend.15.6.0649.
- Breeden, L, and K Nasmyth. 1987. "Similarity between Cell-Cycle Genes of Budding Yeast and Fission Yeast and the Notch Gene of Drosophila." *Nature* 329: 651–54. doi:10.1038/329651a0.
- Brown, Greg, Alex Singer, Michael Proudfoot, Tatiana Skarina, Youngchang Kim, Changsoo Chang, Irina Dementieva, et al. 2009. "Functional and Structural Characterization of Four Glutaminases from Escherichia Coli and Bacillus Subtilis." *Biochemistry* 47 (21): 5724–35. doi:10.1021/bi800097h.Functional.
- Burgermeister, E., D. Chuderland, T. Hanoch, M. Meyer, M. Liscovitch, and R. Seger. 2007. "Interaction with MEK Causes Nuclear Export and Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ." *Molecular and Cellular Biology* 27 (3): 803–17. doi:10.1128/MCB.00601-06.
- Burgermeister, Elke, and Rony Seger. 2007. "MAPK Kinases as Nucleo-Cytoplasmic Shuttles for PPARgamma." *Cell Cycle* 6 (13): 1539–48. doi:10.4161/cc.6.13.4453.
- Campos-Sandoval, José A., Amada R. López de la Oliva, Carolina Lobo, Juan A. Segura, José M. Matés, Francisco J. Alonso, and Javier Márquez. 2007. "Expression of Functional Human Glutaminase in Baculovirus System: Affinity Purification, Kinetic and Molecular Characterization." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39 (4): 765–73. doi:10.1016/j.biocel.2006.12.002.
- Cardona, Carolina, Elisabeth Sánchez-Mejías, José C. Dávila, Mercedes Martín-Rufián, José A. Campos-Sandoval, Javier Vitorica, Francisco J. Alonso, et al. 2015. "Expression of Glis and Glis2 Glutaminase Isoforms in Astrocytes." *GLIA* 63 (3): 365–82. doi:10.1002/glia.22758.
- Casas, François, Lionel Domenjoud, Pierrick Rochard, Renée Hatier, Anne Rodier, Laetitia Daury, Arnaud Bianchi, et al. 2000. "A 45 kDa Protein Related to PPARγ2, Induced by Peroxisome Proliferators, Is Located in the Mitochondrial Matrix." *FEBS Letters* 478 (1–2): 4–8. doi:10.1016/S0014-5793(00)01814-7.
- Cassago, Alexandre, Amanda P S Ferreira, Igor M Ferreira, Camila Fornezari, Emerson R M Gomes, Kai Su Greene, Humberto M Pereira, Richard C Garratt, Sandra M G Dias, and Andre L B Ambrosio. 2012. "Mitochondrial Localization and Structure-Based Phosphate Activation Mechanism of Glutaminase C with Implications for Cancer Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4): 1092–97. doi:10.1073/pnas.1112495109.

- Cassago, Carolina Aparecida De Guzzi. 2016. "Avaliação Da Interação Da Glutaminase Isoforma Kidney-Type (KGA) Com Receptor Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARγ)." (Tese de Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
- Chang, Tsung-Cheng, Duonan Yu, Yun-Sil Lee, Erik A Wentzel, Dan E Arking, Kristin M West, Chi V Dang, Andrei Thomas-Tikhonenko, and Joshua T Mendell. 2008. "Widespread microRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis." *Nature Genetics* 40 (1): 43–50. doi:10.1038/ng.2007.30.
- Chen, Xin, Li Yang, and Suo Di Zhai. 2012. "Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality among Diabetic Patients Prescribed Rosiglitazone or Pioglitazone: A Meta-Analysis of Retrospective Cohort Studies." *Chinese Medical Journal* 125 (23): 4301–6. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.23.025.
- Chhabra, Ravindresh, Richa Dubey, and Neeru Saini. 2010. "Cooperative and Individualistic Functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 Cluster and Its Implication in Human Diseases." *Molecular Cancer* 9: 232. doi:10.1186/1476-4598-9-232.
- Chiswell, Brian P, Rong Zhang, James W Murphy, Titus J Boggon, and David a Calderwood. 2008. "The Structural Basis of Integrin-Linked Kinase-PINCH Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52): 20677–82. doi:10.1073/pnas.0811415106.
- Clark, Karen, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, and Eric W. Sayers. 2016. "GenBank." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D67–72. doi:10.1093/nar/gkv1276.
- Colombo, Sergio L, Miriam Palacios-Callender, Nanci Frakich, Joel De Leon, Christoph A Schmitt, Leanne Boorn, Nicola Davis, and Salvador Moncada. 2010. "Anaphase-Promoting Complex/cyclosome-Cdh1 Coordinates Glycolysis and Glutaminolysis with Transition to S Phase in Human T Lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (44): 18868–73. doi:10.1073/pnas.1012362107.
- Curthoys, Norman P, and Malcolm Watford. 1995. "Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 15: 133–59. doi:10.1146/annurev.nutr.15.1.133.
- Curthoys, P, Theresa Kuhlenschmidt, Robert F Weiss, and Susan S Godfrey. 1976. "Phosphate-Dependent Activity Glutaminase from Rat Kidney and Identity with Glutaminase in Response to Acidosis from Other Tissues." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 172: 162–67.
- DeBerardinis, R J, and T Cheng. 2010. "Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer." *Oncogene* 29 (3). Nature Publishing Group: 313–24. doi:10.1038/onc.2009.358.
- Dehal, P. 2002. "The Draft Genome of Ciona Intestinalis: Insights into Chordate and Vertebrate Origins." *Science* 298 (5601): 2157–67. doi:10.1126/science.1080049.
- DeLaBarre, Byron, Stefan Gross, Cheng Fang, Yi Gao, Abhishek Jha, Fan Jiang, Juanhua Song J, Wentao Wei, and Jonathan B Hurov. 2011. "Full-Length Human Glutaminase in Complex with an Allosteric Inhibitor." *Biochemistry* 50 (50): 10764–70. doi:10.1021/bi201613d.
- Desvergne, Béatrice, and Walter Wahli. 1999. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors : Nuclear Control of Metabolism*." *Endocrine Reviews* 20 (5): 649–88. doi:10.1210/edrv.20.5.0380.
- Di Fiore, Pier Paulo, Pier Gluseppe Pelicci, and Alexander Sorkin. 1997. "EH: A Novel Protein-Protein Interaction Domain Potentially Involved in Intracellular Sorting." *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(97)01127-4.
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.
- Eilers, Martin, and Robert N. Eisenman. 2008. "Myc's Broad Reach." *Genes and Development*. doi:10.1101/gad.1712408.
- Elgadi, Khaled M, Robert A Meguid, Ming Qian, Wiley W Souba, and Steve F Abcouwer. 1999. "Cloning and Analysis of Unique Human Glutaminase Isoforms Generated by Tissue-Specific Alternative Splicing Cloning and Analysis of Unique Human Glutaminase Isoforms Generated by Tissue-Specific Alternative Splicing." *Physiological Genomics* 1 (2): 51–62.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan. 2010. "Features and Development of Coot." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (4): 486–501. doi:10.1107/S0907444910007493.
- Escher, P, and W Wahli. 2000. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Insight into Multiple Cellular Functions." *Mutation Research* 448 (2): 121–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725467>.
- Evans, Philip R., and Garib N. Murshudov. 2013. "How Good Are My Data and What Is the Resolution?" *Acta*

- Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69 (7): 1204–14. doi:10.1107/S0907444913000061.
- Ewing, Rob M, Peter Chu, Fred Elisma, Hongyan Li, Paul Taylor, Shane Climie, Linda McBroom-Cerajewski, et al. 2007. "Large-Scale Mapping of Human Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry." *Mol Syst Biol* 3 (89): 89. doi:10.1038/msb4100134.
- Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, a.-M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, et al. 1997. "The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR Gene." *Journal of Biological Chemistry* 272 (30): 18779–89. doi:10.1074/jbc.272.30.18779.
- Farr, Abigail, and Ann Roman. 1992. "A Pitfall of Using a Second Plasmid to Determine Transfection Efficiency." *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/20.4.920.
- Ferreira, Amanda Petrina Scotá. 2013. "Entendendo O Mecanismo de Ativação E as Diferenças Cinéticas Entre as Isoformas Kidney-Type Glutaminase E Glutaminase C." (Dissertação de mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
- Ferreira, Amanda Petrina Scotá, Alexandre Cassago, Kaliandra De Almeida Gonçalves, Marília Meira Dias, Douglas Adamoski, Caroline Fernanda Rodrigues Ascensão, Rodrigo Vargas Honorato, et al. 2013. "Active Glutaminase C Self-Assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (39): 28009–20. doi:10.1074/jbc.M113.501346.
- Fontana, Angelo, Patrizia Poverino De Laureto, Barbara Spolaore, Erica Frare, Paola Picotti, and Marcello Zambonin. 2004. "Probing Protein Structure by Limited Proteolysis." *Acta Biochimica Polonica* 51 (2): 299–321. doi:035001299.
- Gaglio, Daniela, Christian M Metallo, Paulo A Gameiro, Karsten Hiller, Lara Sala Danna, Chiara Balestrieri, Lilia Alberghina, Gregory Stephanopoulos, and Ferdinando Chiaradonna. 2011. "Oncogenic K-Ras Decouples Glucose and Glutamine Metabolism to Support Cancer Cell Growth." *Molecular Systems Biology* 7 (523): 523. doi:10.1038/msb.2011.56.
- Gao, Ping, Irina Tchernyshyov, Tsung-Cheng Chang, Yun-Sil Lee, Kayoko Kita, Takafumi Ochi, Karen I Zeller, et al. 2009. "C-Myc Suppression of miR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism." *Nature* 458 (7239): 762–65. doi:10.1038/nature07823.
- Garcia-Cao, Isabel, Min Sup Song, Robin M. Hobbs, Gaëlle Laurent, Carlotta Giorgi, Vincent C J De Boer, Dimitrios Anastasiou, et al. 2012. "Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State." *Cell* 149 (1): 49–62. doi:10.1016/j.cell.2012.02.030.
- Gearing, K L, M Göttlicher, M Teboul, E Widmark, and J A Gustafsson. 1993. "Interaction of the Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor and Retinoid X Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (4): 1440–44. doi:10.1073/pnas.90.4.1440.
- Godfrey, S, T Kuhlenschmidt, and P Curthoys. 1977. "Correlation between Activation and Dimer Formation of Rat Renal Phosphate-Dependent Glutaminase." *The Journal of Biological Chemistry* 252 (6): 1927–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/845154>.
- Gomes, Emerson Rodrigo Machi. 2013. "Caracterização Bioquímica E Celular Da Glutaminase Isoforma Kidney-Type Com Seus Parceiros de Interação." (Dissertação de mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
- Gomes, Aldrin V, James D Potter, and Danuta Szczesna-Cordary. 2002. "The Role of Troponins in Muscle Contraction." *IUBMB Life* 54 (6): 323–33. doi:10.1080/15216540216037.
- Gómez-Fabre, P M, J C Aledo, a Del Castillo-Olivares, F J Alonso, I Núñez De Castro, J a Campos, and J Márquez. 2000. "Molecular Cloning, Sequencing and Expression Studies of the Human Breast Cancer Cell Glutaminase." *The Biochemical Journal* 345 Pt 2 (January): 365–75. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1220766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gorina, S., and N. P. Pavletich. 1996. "Structure of the p53 Tumor Suppressor Bound to the Ankyrin and SH3 Domains of 53BP2." *Science (New York, N. Y.)* 274 (5289): 1001–5. doi:10.1126/science.274.5289.1001.
- Gross, Matt I, Susan D Demo, Jennifer B Dennison, Lijing Chen, Tania Chernov-Rogan, Bindu Goyal, Julie R Janes, et al. 2014. "Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (April): 890–901. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0870.
- Grove, Tijana Z., Aitziber L. Cortajarena, and Lynne Regan. 2008. "Ligand Binding by Repeat Proteins: Natural and Designed." *Current Opinion in Structural Biology*. doi:10.1016/j.sbi.2008.05.008.
- Hellsten, Uffe, Richard M Harland, Michael J Gilchrist, David Hendrix, Jerzy Jurka, Vladimir Kapitonov, Ivan Ovcharenko, et al. 2010. "The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*." *Science (New York, N. Y.)* 328 (5978): 633–36. doi:10.1126/science.1183670.

- Hesketh, Geoffrey, Inmaculada Perez-Dorado, Lauren P. Jackson, Lena Wartosch, Ingmar B. Schaffer, Sally R. Gray, Airlie J. McCoy, et al. 2014. "VARP Is Recruited on to Endosomes by Direct Interaction with Retromer, Where Together They Function in Export to the Cell Surface." *Developmental Cell* 29 (5): 591–606. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.010.
- Holzer, Sandro, Nenad Ban, and Sebastian Klinge. 2013. "Crystal Structure of the Yeast Ribosomal Protein rpS3 in Complex with Its Chaperone yar1." *Journal of Molecular Biology* 425 (22): 4154–60. doi:10.1016/j.jmb.2013.08.022.
- Howe, Kerstin, Matthew D Clark, Carlos F Torroja, James Tarrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E Joanna E Collins, et al. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496 (7446): 498–503. doi:10.1038/nature12111.
- Hu, Wenwei, Cen Zhang, Rui Wu, Yvonne Sun, Arnold Levine, and Zhaohui Feng. 2010. "Glutaminase 2, a Novel p53 Target Gene Regulating Energy Metabolism and Antioxidant Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 VN- (16): 7455–60. doi:10.1073/pnas.1001006107.
- Huang, Xiaoqiu, and Webb Miller. 1991. "A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm." *Advances in Applied Mathematics* 12 (3): 337–57. doi:10.1016/0196-8858(91)90017-D.
- Huttlin, Edward L., Lily Ting, Raphael J. Bruckner, Fana Gebreab, Melanie P. Gygi, John Szpyt, Stanley Tam, et al. 2015. "The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome." *Cell* 162 (2): 425–40. doi:10.1016/j.cell.2015.06.043.
- Isseemann, Isabelle, and Stephen Green. 1990. "Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators." *Nature* 347: 645–50. doi:10.1016/0021-9797(80)90501-9.
- Jacobs, Marc D., and Stephen C. Harrison. 1998. "Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex." *Cell* 95 (6): 749–58. doi:10.1016/S0092-8674(00)81698-0.
- Jeffery, Constance J. 1999. "Moonlighting Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(98)01335-8.
- Kabsch, Wolfgang. 2010. "XDS." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (2): 125–32. doi:10.1107/S0907444909047337.
- Kelly, Denise, Jamie I Campbell, Timothy P King, George Grant, Emmelie a Jansson, Alistair G P Coutts, Sven Pettersson, and Shaun Conway. 2004. "Commensal Anaerobic Gut Bacteria Attenuate Inflammation by Regulating Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of PPAR-Gamma and RelA." *Nature Immunology* 5 (1): 104–12. doi:10.1038/ni1018.
- Kenny, John, Yuhne Bao, Brian Hamm, Lynn Taylor, Ann Toth, Brian Wagers, and Norman P Curthoys. 2003. "Bacterial Expression, Purification, and Characterization of Rat Kidney-Type Mitochondrial Glutaminase." *Protein Expression and Purification* 31 (1): 140–48. doi:10.1016/S1046-5928(03)00161-X.
- Kornau, Hans-Christian, Leslie T Schenker, Mary B Kennedy, and Peter H Seeburg. 1995. "Domain Interaction between NMDA Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein PSD-95." *Source: Science, New Series* 269 (5231): 1737–40. doi:10.1126/science.7569905.
- Kovacevic, Z, and J D McGivan. 1983. "Mitochondrial Metabolism of Glutamine and Glutamate and Its Physiological Significance." *Physiological Reviews* 63 (2): 547–605. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=6132422&retmode=ref&cmd=prlink&s%5Cnpapers2://publication/uuid/97F46058-F553-4727-86B0-12E808E81B09>.
- Krebs, Hans Adolf. 1935. "Metabolism of Aminoacids: The Synthesis of Glutamine from Glutamic Acid and Ammonia, and the Enzymic Hydrolysis of Glutamine in Animal Tissues." *Biochemical Journal* 29 (8): 1951–69.
- Krishnan, Anand, S Asha Nair, and M Radhakrishna Pillai. 2007. "Krishnan, 2007 - Biology of PPAR γ in Cancer A Critical Review on Existing Lacunae.pdf" 2: 532–40.
- Krissinel, Evgeny, and Kim Henrick. 2007. "Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State." *Journal of Molecular Biology* 372 (3): 774–97. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022.
- Kuo, Tsang Chih, Chi Kuan Chen, Kuo Tai Hua, Pei Yu, Wei Jiunn Lee, Min Wei Chen, Yung Ming Jeng, et al. 2016. "Glutaminase 2 Stabilizes Dicer to Repress Snail and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Cells." *Cancer Letters* 383 (2). Elsevier Ltd: 282–94. doi:10.1016/j.canlet.2016.10.012.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85. doi:10.1038/227680a0.

- Lassmann, T, and E L Sonnhammer. 2005. "Kalign--an Accurate and Fast Multiple Sequence Alignment Algorithm." *BMC.Bioinformatics*. 6: 298--. pm:16343337.
- Lee, Junghee, Swati Sharma, Jinho Kim, Robert J. Ferrante, and Hoon Ryu. 2008. "Mitochondrial Nuclear Receptors and Transcription Factors: Who's Minding the Cell?" *Journal of Neuroscience Research*. doi:10.1002/jnr.21564.
- Lee, Su Yeon, Hyun Min Jeon, Min Kyung Ju, Eui Kyong Jeong, Cho Hee Kim, Hye Gyeong Park, Song ly Han, and Ho Sung Kang. 2016. "Dlx-2 and Glutaminase Upregulate Epithelial-Mesenchymal Transition and Glycolytic Switch." *Oncotarget* 7 (7): 7925–39. doi:10.18632/oncotarget.6879.
- Lehrke, Michael, and Mitchell A. Lazar. 2005. "The Many Faces of PPARgamma." *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2005.11.026.
- Leslie, Andrew G W, and Harold R Powell. 2007. "Processing Diffraction Data with Mosflm." *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* 245: 41–51.
- Levine, Arnold J, and Anna M Puzio-Kuter. 2010. "The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes." *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.1193494.
- Levy, Asaf, Noa Sela, and Gil Ast. 2008. "TranspoGene and microTranspoGene: Transposed Elements Influence on the Transcriptome of Seven Vertebrates and Invertebrates." *Nucleic Acids Research* 36 (SUPPL. 1). doi:10.1093/nar/gkm949.
- Lewit-Bentley, A., and S. Réty. 2000. "EF-Hand Calcium-Binding Proteins." *Current Opinion in Structural Biology*. doi:10.1016/S0959-440X(00)00142-1.
- Li, Junan, Anjali Mahajan, and Ming-daw Tsai. 2006. "Current Topics / Perspectives Ankyrin Repeat : A Unique Motif Mediating Protein – Protein Interactions Ankyrin Repeat : A Unique Motif Mediating Protein - Protein Interactions †" 45 (November): 15168–78. doi:10.1021/bi062188q.
- Li, Yongchao, Xiangzhi Meng, Yan Xiang, and Junpeng Deng. 2010. "Structure Function Studies of Vaccinia Virus Host Range Protein k1 Reveal a Novel Functional Surface for Ankyrin Repeat Proteins." *Journal of Virology* 84 (7): 3331–38. doi:10.1128/JVI.02332-09.
- Liu, Juan, Cen Zhang, Meihua Lin, Wei Zhu, Yingjian Liang, Xuehui Hong, Yuhua Zhao, Ken H Young, Wenwei Hu, and Zhaohui Feng. 2014. "Glutaminase 2 Negatively Regulates the PI3K/AKT Signaling and Shows Tumor Suppression Activity in Human Hepatocellular Carcinoma." *Oncotarget* 5 (9): 2635–47. doi:10.18632/oncotarget.1862.
- Lohmann, R, W W Souba, and B P Bode. 1999. "Rat Liver Endothelial Cell Glutamine Transporter and Glutaminase Expression Contrast with Parenchymal Cells." *The American Journal of Physiology* 276: G743–50.
- Luconi, Michaela, Giulia Cantini, and Mario Serio. 2010. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARγ): Is the Genomic Activity the Only Answer?" *Steroids* 75 (8–9): 585–94. doi:10.1016/j.steroids.2009.10.012.
- Lukey, Michael J, Kai Su Greene, Jon W Erickson, Kristin F Wilson, and Richard A Cerione. 2016. "The Oncogenic Transcription Factor c-Jun Regulates Glutaminase Expression and Sensitizes Cells to Glutaminase-Targeted Therapy." *Nature Communications* 7: 11321. doi:10.1038/ncomms11321.
- Mansour, Mahmoud. 2014. *The Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Metabolic Syndrome. Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1sted. Vol. 121. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800101-1.00007-7.
- Márquez, Javier, Amada R López de la Oliva, José M Matés, Juan a Segura, and Francisco J Alonso. 2006. "Glutaminase: A Multifaceted Protein Not Only Involved in Generating Glutamate." *Neurochemistry International* 48 (6–7): 465–71. doi:10.1016/j.neuint.2005.10.015.
- Márquez, Javier, José M Matés, and José A Campos-sandoval. 2016. "Glutaminases." In *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis*, 13:133–71. doi:10.1007/978-3-319-45096-4.
- Márquez, Javier, Marta Tosina, Vanessa de la Rosa, Juan A. Segura, Francisco J. Alonso, José M. Matés, and José A. Campos-Sandoval. 2009. "New Insights into Brain Glutaminases: Beyond Their Role on Glutamatergic Transmission." *Neurochemistry International* 55 (1–3): 64–70. doi:10.1016/j.neuint.2009.02.022.
- Martín-Rufián, Mercedes, Marta Tosina, José A. Campos-Sandoval, Elisa Manzanares, Carolina Lobo, J. A. Segura, Francisco J. Alonso, José M. Matés, and Javier Márquez. 2012. "Mammalian Glutaminase Gls2 Gene Encodes Two Functional Alternative Transcripts by a Surrogate Promoter Usage Mechanism." *PLoS*

- ONE 7 (6). doi:10.1371/journal.pone.0038380.
- McCoy, Airlie J, Ralf W Grosse-Kunstleve, Paul D Adams, Martyn D Winn, Laurent C Storoni, and Randy J Read. 2007. "Phaser Crystallographic Software." *Journal of Applied Crystallography* 40 (Pt 4). International Union of Crystallography: 658–74. doi:10.1107/S0021889807021206.
- Meertens, L M, K S Miyata, J D Cechetto, R A Rachubinski, and J P Capone. 1998. "A Mitochondrial Ketogenic Enzyme Regulates Its Gene Expression by Association with the Nuclear Hormone Receptor PPARalpha." *Embo J* 17 (23): 6972–78. doi:10.1093/emboj/17.23.6972.
- Mosavi, Leila K, Tobin J Cammett, Daniel C Desrosiers, and Zheng-Yu Peng. 2004. "The Ankyrin Repeat as Molecular Architecture for Protein Recognition." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 13 (6): 1435–48. doi:10.1110/ps.03554604.
- Mosavi, Leila K, Daniel L Minor, and Zheng-Yu Peng. 2002. "Consensus-Derived Structural Determinants of the Ankyrin Repeat Motif." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 16029–34. doi:10.1073/pnas.252537899.
- Muhire, Brejnev Muhizi, Arvind Varsani, and Darren Patrick Martin. 2014. "SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation." *PLoS ONE* 9 (9). doi:10.1371/journal.pone.0108277.
- Murphy, Gregory J., and Julie C. Holder. 2000. "PPARgamma Agonists: Therapeutic Role in Diabetes, Inflammation and Cancer." *Trends in Pharmacological Sciences*. doi:10.1016/S0165-6147(00)01559-5.
- Nagy, Laszlo, Peter Tontonoz, Jacqueline G A Alvarez, Hongwu Chen, and Ronald M. Evans. 1998. "Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPARy." *Cell* 93 (2): 229–40. doi:10.1016/S0092-8674(00)81574-3.
- Nettles, Kendall W. 2008. "Insights into PPAR γ from Structures with Endogenous and Covalently Bound Ligands" 15 (9): 893–95.
- Nettles, Kendall W, and Geoffrey L Greene. 2005. "Ligand Control of Coregulator Recruitment to Nuclear Receptors." *Annual Review of Physiology* 67 (January): 309–33. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032802.154710.
- Nissen, Steven E, and Kathy Wolski. 2010. "Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-Analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality." *Archives of Internal Medicine* 170 (14): 1191–1201. doi:10.1001/archinternmed.2010.207.
- Nolte, Robert T, G Bruce Wisely, Stefan Westin, Jeffery E Cobb, Millard H Lambert, Riki Kurokawa, Michael G Rosenfeld, Timothy M Willson, Christopher K Glass, and Michael V Milburn. 1998. "Ligand Binding and Co-Activator Assembly of the Peroxisome," 137–43.
- Olalla, L, J C Aledo, G Bannenberg, and J Márquez. 2001. "The C-Terminus of Human Glutaminase L Mediates Association with PDZ Domain-Containing Proteins." *FEBS Letters* 488 (3): 116–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163757>.
- Olalla, Lucía, Antonia Gutiérrez, José a Campos, Zafar U Khan, Francisco J Alonso, Juan a Segura, Javier Márquez, and J Carlos Aledo. 2002. "Nuclear Localization of L-Type Glutaminase in Mammalian Brain." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (41): 38939–44. doi:10.1074/jbc.C200373200.
- Olalla, Lucía, Antonia Gutiérrez, Antonio J. Jiménez, Juan F. López-Téllez, Zafar U. Khan, Juan Pérez, Francisco J. Alonso, et al. 2008. "Expression of the Scaffolding PDZ Protein Glutaminase-Interacting Protein in Mammalian Brain." *Journal of Neuroscience Research* 86 (2): 281–92. doi:10.1002/jnr.21505.
- Olefsky, J M. 2001. "Nuclear Receptor Minireview Series." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40): 36863–64. doi:10.1074/jbc.R100047200.
- Olsen, Bjørn Reino, Gerd Svenneby, Elling Kvamme, Borghild Tveit, and Trond Eskeland. 1970. "Formation and Ultrastructure of Enzymically Active Polymers of Pig Renal Glutaminase." *Journal of Molecular Biology* 52 (2). doi:10.1016/0022-2836(70)90028-8.
- Otyepka, Michal, Petr Sklenovský, Dominik Horinek, Tomáš Kubař, and Pavel Hobza. 2006. "How the Stabilization of INK4 Tumor Suppressor 3D Structure Evaluated by Quantum Chemical and Molecular Mechanics Calculations Corresponds Well with Experimental Results: Interplay of Association Enthalpy, Entropy, and Solvation Effects." *Journal of Physical Chemistry B* 110 (9): 4423–29. doi:10.1021/jp056890s.
- Owen, Oliver E., Satish C. Kalhan, and Richard W. Hanson. 2002. "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function." *Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30409–12. doi:10.1074/jbc.R200006200.

- Pace, Norman R. 2009. "Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 73 (4): 565–76. doi:10.1128/MMBR.00033-09.
- Pérez-Gómez, Cristina, José M Matés, Pedro M Gómez-Fabre, Antonio del Castillo-Olivares, Francisco J Alonso, and Javier Márquez. 2003. "Genomic Organization and Transcriptional Analysis of the Human L-Glutaminase Gene." *The Biochemical Journal* 370 (Pt 3): 771–84. doi:10.1042/BJ20021445.
- Perissi, V, and M G Rosenfeld. 2005. "Controlling Nuclear Receptors: The Circular Logic of Cofactor Cycles." *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 6 (7): 542–54. doi:10.1038/nrm1682.
- Perrakis, a, R Morris, and V S Lamzin. 1999. "Automated Protein Model Building Combined with Iterative Structure Refinement." *Nature Structural Biology* 6 (5): 458–63. doi:10.1038/8263.
- Pfleger, Cathie M., and Marc W. Kirschner. 2000. "The KEN Box: An APC Recognition Signal Distinct from the D Box Targeted by Cdh1." *Genes and Development* 14 (6): 655–65. doi:10.1101/gad.14.6.655.
- Porter, L David, Hend Ibrahim, Lynn Taylor, and Norman P Curthoys. 2002. "Complexity and Species Variation of the Kidney-Type Glutaminase Gene." *Physiological Genomics* 9 (3): 157–66. doi:10.1152/physiolgenomics.00017.2002.
- Putnam, Nicholas H, Thomas Butts, David E K Ferrier, Rebecca F Furlong, Uffe Hellsten, Takeshi Kawashima, Marc Robinson-Rechavi, et al. 2008. "The Amphioxus Genome and the Evolution of the Chordate Karyotype." *Nature* 453 (7198): 1064–71. doi:10.1038/nature06967.
- Qing, Guoliang, Bo Li, Annette Vu, Nicolas Skuli, Zandra E. Walton, Xueyuan Liu, Patrick A. Mayes, et al. 2012. "ATF4 Regulates MYC-Mediated Neuroblastoma Cell Death upon Glutamine Deprivation." *Cancer Cell* 22 (5): 631–44. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.021.
- Rathore, Moez G., Anne Saumet, Jean François Rossi, Carine De Bettignies, Denis Tempé, Charles Henri Lecellier, and Martin Villalba. 2012. "The NF-κB Member p65 Controls Glutamine Metabolism through miR-23a." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44 (9): 1448–56. doi:10.1016/j.biocel.2012.05.011.
- Redis, Roxana S., Luz E. Vela, Weiqin Lu, Juliana Ferreira de Oliveira, Cristina Ivan, Cristian Rodriguez-Aguayo, Douglas Adamoski, et al. 2016. "Allele-Specific Reprogramming of Cancer Metabolism by the Long Non-Coding RNA CCAT2." *Molecular Cell* 61 (4): 520–34. doi:10.1016/j.molcel.2016.01.015.
- Robbins, Gregory T, and Daotai Nie. 2012. "PPARgamma, Bioactive Lipids, and Cancer Progression Gregory." *Frontiers in Bioscience* 17: 1816–34.
- Robin, Gautier, Yoshiteru Sato, Dominique Desplancq, Natacha Rochel, Etienne Weiss, and Pierre Martineau. 2014. "Restricted Diversity of Antigen Binding Residues of Antibodies Revealed by Computational Alanine Scanning of 227 Antibody-Antigen Complexes." *Journal of Molecular Biology* 426 (22). Elsevier B.V.: 3729–43. doi:10.1016/j.jmb.2014.08.013.
- Robinson, Mary M, Steven J McBryant, Takashi Tsukamoto, Camilo Rojas, Dana V Ferraris, Sean K Hamilton, Jeffrey C Hansen, and Norman P Curthoys. 2007. "Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-Phenylacetamido-1,2,4-Thiadiazol-2-Yl)ethyl Sulfide (BPTES)." *The Biochemical Journal* 406 (3): 407–14. doi:10.1042/BJ20070039.
- Rosen, E D, and B M Spiegelman. 2001. "PPARgamma : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 37731–34. doi:10.1074/jbc.R100034200.
- Russo, a a, L Tong, J O Lee, P D Jeffrey, and N P Pavletich. 1998. "Structural Basis for Inhibition of the Cyclin-Dependent Kinase Cdk6 by the Tumour Suppressor p16INK4a." *Nature* 395 (6699): 237–43. doi:10.1038/26155.
- Schliep, Klaus Peter. 2011. "Phangorn: Phylogenetic Analysis in R." *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (4): 592–93. doi:10.1093/bioinformatics/btq706.
- Scott, A. P. 1987. "Reproductive Endocrinology of Fish." In *Of Comparative Vertebrate Endocrinology*, 223–256. New York, NY: Springer US.
- Sedgwick, S G, S G Sedgwick, S J Smerdon, and S J Smerdon. 1999. "The Ankyrin Repeat: A Diversity of Interaction on a Common Structural Framework." *Trends Biochemical Sciences* 4 (4): 311–16.
- Shapiro, R a, R F Morehouse, and N P Curthoys. 1982. "Inhibition by Glutamate of Phosphate-Dependent Glutaminase of Rat Kidney." *The Biochemical Journal* 207 (3): 561–66. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1153898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shapiro, Richard A, Lynn Farrell, Maithreyan Srinivasan, and Norman P Curthoys. 1991. "Isolation,

- Characterization, and in Vitro Expression of a cDNA That Encodes the Kidney Isoenzyme of the Mitochondrial Glutaminase." *The Journal of Biological Chemistry* 266 (28): 18792–96.
- Sheldrick, George M. 2010. "Experimental Phasing with SHELXC/D/E: Combining Chain Tracing with Density Modification." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (4): 479–85. doi:10.1107/S0907444909038360.
- Shiau, a K, D Barstad, P M Loria, L Cheng, P J Kushner, D a Agard, and G L Greene. 1998. "The Structural Basis of Estrogen Receptor/coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen." *Cell* 95 (7): 927–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875847>.
- Smith, Jeremiah, Shigehiro Kuraku, Carson Holt, Sauka-Spengler Tatjana, Ning Jiang, Michael Campbell, Mark Yandell, et al. 2013. "Sequencing of the Sea Lamprey (*Petromyzon Marinus*) Genome Provides Insights into Vertebrate Evolution." *Nature Genetics* 45 (4): 415–21, 421e1. doi:10.1038/ng.2568.
- Smith, M, and Malcolm Watford. 1990. "Molecular Cloning of a cDNA for Rat Hepatic Glutaminase. Sequence Similarity to Kidney-Type Glutaminase." *Journal of Biological Chemistry* 265: 10631–36.
- Son, Jaekyoung, Costas a Lyssiotis, Haoqiang Ying, Xiaoxu Wang, Sujun Hua, Matteo Ligorio, Rushika M Perera, et al. 2013. "Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway." *Nature* 496 (7443). Nature Publishing Group: 101–5. doi:10.1038/nature12040.
- Sonawane, N. D., Francis C. Szoka, and A. S. Verkman. 2003. "Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes." *Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44826–31. doi:10.1074/jbc.M308643200.
- Stamatakis, Alexandros. 2014. "RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies." *Bioinformatics* 30 (9): 1312–13. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Stevens, F C. 1983. "Calmodulin: An Introduction." *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 61: 906–10. doi:10.1139/o83-115.
- Sukumaran, Jeet, and Mark T. Holder. 2010. "DendroPy: A Python Library for Phylogenetic Computing." *Bioinformatics* 26 (12): 1569–71. doi:10.1093/bioinformatics/btq228.
- Suzuki, Sawako, Tomoaki Tanaka, Masha V Poyurovsky, Hidekazu Nagano, Takafumi Mayama, Shuichi Ohkubo, Maria Lokshin, et al. 2010. "Phosphate-Activated Glutaminase (GLS2), a p53-Inducible Regulator of Glutamine Metabolism and Reactive Oxygen Species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16): 7461–66. doi:DOI 10.1073/pnas.1002459107.
- Szeliga, Monika, and Jan Albrecht. 2015. "Opposing Roles of Glutaminase Isoforms in Determining Glioblastoma Cell Phenotype." *Neurochemistry International* 88: 6–9. doi:10.1016/j.neuint.2014.11.004.
- Szeliga, Monika, Małgorzata Bogacińska-Karaś, Aleksandra Rózycka, Wojciech Hilgier, Javier Marquez, and Jan Albrecht. 2014. "Silencing of GLS and Overexpression of GLS2 Genes Cooperate in Decreasing the Proliferation and Viability of Glioblastoma Cells." *Tumor Biology* 35 (3): 1855–62. doi:10.1007/s13277-013-1247-4.
- Takeda, Shuichi, Shiho Minakata, Ryotaro Koike, Ichiro Kawahata, Akihiro Narita, Masashi Kitazawa, Motonori Ota, Tohru Yamakuni, Yuichiro Maeda, and Yasushi Nitani. 2010. "Two Distinct Mechanisms for Actin Capping Protein Regulation-Steric and Allosteric Inhibition." *PLoS Biology* 8 (7). doi:10.1371/journal.pbio.1000416.
- Tatusov, R L, E V Koonin, and D J Lipman. 1997. "A Genomic Perspective on Protein Families." *Science* 278 (5338): 631–37. doi:DOI 10.1126/science.278.5338.631.
- Thangavelu, K, Catherine Qiurong Pan, Tobias Karlberg, Ganapathy Balaji, Mahesh Uttamchandani, Valiyaveetil Suresh, Herwig Schöler, Boon Chuan Low, and J Sivaraman. 2012. "Structural Basis for the Allosteric Inhibitory Mechanism of Human Kidney-Type Glutaminase (KGA) and Its Regulation by Raf-Mek-Erk Signaling in Cancer Cell Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (20): 7705–10. doi:10.1073/pnas.1116573109.
- Timmerman, Luika A., Thomas Holton, Mariia Yuneva, Raymond J. Louie, Merc?? Padr??, Anneleen Daemen, Min Hu, et al. 2013. "Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target." *Cancer Cell* 24 (4): 450–65. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.020.
- Tontonoz, P, E Hu, R a Graves, a I Budavari, and B M Spiegelman. 1994. "mPPAR Gamma 2: Tissue-Specific Regulator of an Adipocyte Enhancer." *Genes & Development* 8 (10): 1224–34. doi:10.1101/gad.8.10.1224.
- Vagin, Alexei A., Roberto A. Steiner, Andrey A. Lebedev, Liz Potterton, Stuart McNicholas, Fei Long, and Garib N. Murshudov. 2004. "REFMAC5 Dictionary: Organization of Prior Chemical Knowledge and Guidelines for

- Its Use." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60 (12 I): 2184–95. doi:10.1107/S0907444904023510.
- Van Den Heuvel, A. Pieter J, Junping Jing, Richard F. Wooster, and Kurtis E. Bachman. 2012. "Analysis of Glutamine Dependency in Non-Small Cell Lung Cancer: GLS1 Splice Variant GAC Is Essential for Cancer Cell Growth." *Cancer Biology and Therapy* 13 (12): 1185–94. doi:10.4161/cbt.21348.
- Venkatesh, Byrappa, Alison P Lee, Vydianathan Ravi, Ashish K Maurya, Michelle M Lian, Jeremy B Swann, Yuko Ohta, et al. 2014. "Elephant Shark Genome Provides Unique Insights into Gnathostome Evolution." *Nature* 505 (7482): 174–79. doi:10.1038/nature12826.
- Von Knethen, Andreas, Mathias Soller, Nico Tzieply, Andreas Weigert, Axel M. Johann, Carla Jennewein, Roman Köhl, and Bernhard Brüne. 2007. "PPARgamma1 Attenuates Cytosol to Membrane Translocation of PKCalpha to Desensitize Monocytes/macrophages." *Journal of Cell Biology* 176 (5): 681–94. doi:10.1083/jcb.200605038.
- von Knethen, Andreas, Nico Tzieply, Carla Jennewein, and Bernhard Brüne. 2010. "Casein-Kinase-II-Dependent Phosphorylation of PPARgamma Provokes CRM1-Mediated Shuttling of PPARgamma from the Nucleus to the Cytosol." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 2): 192–201. doi:10.1242/jcs.055475.
- Wang, Yan, and Yongfeng Shang. 2013. "Epigenetic Control of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis." *Experimental Cell Research*. doi:10.1016/j.yexcr.2012.07.019.
- Wang, Jian Bin, Jon W. Erickson, Reina Fuji, Sekar Ramachandran, Ping Gao, Ramani Dinavahi, Kristin F. Wilson, et al. 2010. "Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation." *Cancer Cell* 18 (3): 207–19. doi:10.1016/j.ccr.2010.08.009.
- Weinberg, Frank, Robert Hamanaka, William W Wheaton, Samuel Weinberg, Joy Joseph, Marcos Lopez, Balaraman Kalyanaraman, Gökhan M Mutlu, G R Scott Budinger, and Navdeep S Chandel. 2010. "Mitochondrial Metabolism and ROS Generation Are Essential for Kras-Mediated Tumorigenicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8788–93. doi:10.1073/pnas.1003428107.
- White, John H., Isabelle Fernandes, Sylvie Mader, and Xiang Jiao Yang. 2004. "Corepressor Recruitment by Agonist-Bound Nuclear Receptors." *Vitamins and Hormones* 68: 123–43. doi:10.1016/S0083-6729(04)68004-6.
- Wilson, Jeffrey J., and Rhett A. Kovall. 2006. "Crystal Structure of the CSL-Notch-Mastermind Ternary Complex Bound to DNA." *Cell* 124 (5): 985–96. doi:10.1016/j.cell.2006.01.035.
- Wise, David R, Ralph J DeBerardinis, Anthony Mancuso, Nabil Sayed, Xiao-Yong Zhang, Harla K Pfeiffer, Ilana Nissim, et al. 2008. "Myc Regulates a Transcriptional Program That Stimulates Mitochondrial Glutaminolysis and Leads to Glutamine Addiction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48): 18782–87. doi:10.1073/pnas.0810199105.
- Xia, Zheng, Lawrence A Donehower, Thomas A Cooper, Joel R Neilson, David A Wheeler, Eric J Wagner, and Wei Li. 2014. "Dynamic Analyses of Alternative Polyadenylation from RNA-Seq Reveal a 3'-UTR Landscape across Seven Tumour Types." *Nature Communications* 5: 5274. doi:10.1038/ncomms6274.
- Xiang, Lisha, Ganfeng Xie, Chen Liu, Jie Zhou, Jianfang Chen, Songtao Yu, Jianjun Li, Xueli Pang, Hang Shi, and Houjie Liang. 2013. "Knock-down of Glutaminase 2 Expression Decreases Glutathione, NADH, and Sensitizes Cervical Cancer to Ionizing Radiation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833 (12): 2996–3005. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.08.003.
- Xiao, Daibiao, Ping Ren, Hexiu Su, Ming Yue, Ruijuan Xiu, Yufeng Hu, Hudan Liu, and Guoliang Qing. 2015. "Myc Promotes Glutaminolysis in Human Neuroblastoma through Direct Activation of Glutaminase 2." *Oncotarget* 6 (38): 40655–66. doi:10.18632/oncotarget.5821.
- Xu, H. Eric, Thomas B. Stanley, Valerie G. Montana, Millard H. Lambert, Barry G. Shearer, Jeffery E. Cobb, David D. McKee, et al. 2002. "Structural Basis for Antagonist-Mediated Recruitment of Nuclear Co-Repressors by PPARalpha." *Nature* 415 (6873): 813–17. doi:10.1038/415813a.
- Yasmin, Sabina, and Venkatesan Jayaprakash. 2016. "Thiazolidinediones and PPAR Orchestra as Antidiabetic Agents: From Past to Present." *European Journal of Medicinal Chemistry* 126. Elsevier Masson SAS: 879–93. doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.020.
- Yelamanchi, Soujanya D., Savita Jayaram, Joji Kurian Thomas, Seetaramanjaneyulu Gundimeda, Aafaque Ahmad Khan, Anish Singhal, T. S. Keshava Prasad, Akhilesh Pandey, B. L. Somani, and Harsha Gowda. 2016. "A Pathway Map of Glutamate Metabolism." *Journal of Cell Communication and Signaling* 10 (1): 69–75. doi:10.1007/s12079-015-0315-5.

Zhang, Cen, Juan Liu, Yuhao Zhao, Xuetian Yue, Yu Zhu, Xiaolong Wang, Hao Wu, et al. 2016. "Glutaminase 2 Is a Novel Negative Regulator of Small GTPase Rac1 and Mediates p53 Function in Suppressing Metastasis" 1 (January): 1–20. doi:10.7554/eLife.10727.

9. ANEXOS

9.1. Artigo publicado na revista Journal of Biological Chemistry (JBC).

The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats

Received for publication, March 21, 2017, and in revised form, May 11, 2017. Published, Papers in Press, May 19, 2017, DOI 10.1074/jbc.M117.787291

Camila Cristina Pasquali^{‡1}, Zeyaul Islam^{‡1}, Douglas Adamoski^{‡1}, Igor Monteze Ferreira^{‡5}, Ricardo Diogo Righeto^{¶||2}, Jefferson Bettini[¶], Rodrigo Villares Portugal[¶], Wyatt Wai-yin Yue[§], Ana Gonzalez^{**}, Sandra Martha Gomes Dias^{‡3}, and Andre Luis Berteli Ambrosio^{‡4}

From the [‡]Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil, the [§]Structural Genomics Consortium, University of Oxford, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom, the [¶]Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil, the ^{||}School of Electrical and Computer Engineering, University of Campinas, São Paulo 13083-852, Brazil, and the ^{**}Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, Menlo Park, California 94025

Edited by Norma Allewell

On the basis of tissue-specific enzyme activity and inhibition by catalytic products, Hans Krebs first demonstrated the existence of multiple glutaminases in mammals. Currently, two human genes are known to encode at least four glutaminase isoforms. However, the phylogeny of these medically relevant enzymes remains unclear, prompting us to investigate their origin and evolution. Using prokaryotic and eukaryotic glutaminase sequences, we built a phylogenetic tree whose topology suggested that the multidomain architecture was inherited from bacterial ancestors, probably simultaneously with the hosting of the proto-mitochondrion endosymbiont. We propose an evolutionary model wherein the appearance of the most active enzyme isoform, glutaminase C (GAC), which is expressed in many cancers, was a late retrotransposition event that occurred in fishes from the Chondrichthyes class. The ankyrin (ANK) repeats in the glutaminases were acquired early in their evolution. To obtain information on ANK folding, we solved two high-resolution structures of the ANK repeat-containing C termini of both kidney-type glutaminase (KGA) and GLS2 isoforms (glutaminase B and liver-type glutaminase). We found that the glutaminase ANK repeats form unique intramolecular contacts through two highly conserved motifs; curiously, this arrangement occludes a region usually involved in ANK-mediated protein-protein interactions. We also solved the crystal structure of full-length KGA and present a small-angle X-ray scattering model for full-

length GLS2. These structures explain these proteins' compromised ability to assemble into catalytically active supra-tetrameric filaments, as previously shown for GAC. Collectively, these results provide information about glutaminases that may aid in the design of isoform-specific glutaminase inhibitors.

Glutamine, the most abundant amino acid in human plasma and muscles (1), is consumed by rapidly proliferating tumor cells to meet their increased energy and biosynthetic precursor demands (2, 3). The enzyme glutaminase converts glutamine into glutamate, which is further catabolized to produce ATP, nucleotides, amino acids, lipids, and glutathione. In this regard, glutaminase is a well established target for the inhibition of cell transformation (4). Accordingly, several oncogenes and tumor suppressors have already been described to be involved in glutaminase-dependent glutamine breakdown (4). Notably, c-Myc stimulates glutamine uptake and degradation by GLS (specifically the product of the *GLS* gene) to sustain cellular viability and Krebs cycle anaplerosis (5). Similarly, nuclear factor- κ B (NF- κ B) enhances glutamine metabolism by decreasing the expression of miR-23a, which targets the *GLS* mRNA (6); Rho GTPases, ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)-Cdh1, and c-Jun also regulate glutamine metabolism by acting on *GLS* and consequently supporting cancer growth (7–9). However, a second gene encodes another glutaminase enzyme, named *GLS2*. In contrast to *GLS*, *GLS2* is regulated by the tumor suppressor p53 and has tumor suppressor features toward gliomas, glioblastomas, lung cancer, and hepatocarcinomas (10–14).

The existence of multiple glutaminases in mammals was first reported by Hans Krebs (15), on the basis of the detection of tissue-specific kinetic parameters and their susceptibility to inhibition by their catalytic products, when he probed the conversion of glutamine into glutamate in tissue extracts. In addition to being expressed by two different genes, at least four glutaminase isoforms have been described in mammals. The kidney-type isoforms, kidney-type glutaminase (KGA)⁵ and

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 2014/20673–2 (to A. L. B. A.), Grant 2015/25832–4 (to S. M. G. D.), Scholarship 2014/19518–2 (to C. C. P.), Fellowship 2014/12663–7 (to Z. I.), Scholarship 2014/17820–3 (to D. A.), and Scholarship 2013/05668–0 (to I. M. F.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

This article contains supplemental Table S1 and Fig. S1.

The atomic coordinates and structure factors (codes 5u0i, 5u0j, 5u0k, and 5uqe) have been deposited in the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Center for Cellular Imaging and NanoAnalytics (C-CINA), Biozentrum, University of Basel, Basel, CH-4058, Switzerland.

³ To whom correspondence may be addressed. E-mail: sandra.dias@lnbio.cnpem.br.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, CNPEM, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Pólo II de Alta Tecnologia, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil. Tel.: 55-19-3512-1115; Fax: 55-19-3512-1004; E-mail: andre.ambrosio@lnbio.cnpem.br.

⁵ The abbreviations used are: KGA, kidney-type glutaminase; LGA, liver-type glutaminase; GAB, glutaminase B; ANK, ankyrin; STAS, sulfate transporter and anti- σ factor antagonist; EH, Eps15 homology; SAD, single-wavelength anomalous dispersion; r.m.s., root mean square; BPTES, (bis-2[5-phenylac-

glutaminase C (GAC), are generated by alternative splicing of the *GLS* gene (2q32.2). Both isoforms are activated by inorganic phosphate and inhibited by glutamate (16–18). In contrast, the liver-type isozymes, liver-type glutaminase (LGA) and glutaminase B (GAB), originate from the *GLS2* gene (12q13.3) through the use of alternative transcription initiation sites (19). The recombinant construct that spans a common region between the *GLS2* isoforms responds poorly to phosphate (20) and is not inhibited by glutamate (19, 21).

Although both the kidney isozymes and GAB are expected to be localized in the mitochondrial matrix because of the transit peptide sequences at their N termini, KGA and LGA can also localize to the cytosol and nuclei (20, 22). However, GAC has been shown to be exclusively located in the mitochondrion (20). Moreover, GAC provides key growth advantages to cancer cells (20). KGA, LGA, and GAB share a glutaminase domain that is well conserved in sequence and structurally similar to bacterial glutaminases, and it is flanked by a long N-terminal domain folded in an EF-hand-like four-helix bundle and a C-terminal domain with three putative ANK repeats (20). In contrast, GAC has a shorter, 48-amino acid-long C terminus with no canonical motif or domain. GAC is also unique because it assembles into highly active, long double-stranded helical filaments in the presence of inorganic phosphate, whereas KGA forms shorter and less active structures under the same conditions (23).

Intrigued by the diversity in numbers, architecture, mechanism of activation, and enzymatic capabilities of the human glutaminases, we felt motivated to investigate the origin, evolution, and possible functions of such complex features. First, by identifying homologous prokaryotic and eukaryotic sequences and building a phylogenetic tree, we propose that the multidomain architecture of the mammalian glutaminases GLS and *GLS2* is a feature inherited from bacterial ancestors, probably simultaneously with the hosting of the proto-mitochondrion endosymbiont. From this phylogenetic tree, we also propose an evolutionary model wherein a *GLS*-like predecessor gene in tunicates gave rise to the currently known human isozymes through exon remodeling, gene duplication, and retrotransposition events. In addition, we solved high-resolution crystallographic structures of the C-terminal ANK repeats from both human KGA and GAB/LGA. These structures display a unique type of dimerization for ANK domains, governed by two short amino acid motifs that are highly conserved from bacteria to higher eukaryotes. Finally, we present the first C terminus-containing crystallographic structure of human KGA, which explains its inability to assemble into the catalytically active supra-tetrameric filaments, as previously shown for GAC. A similar model for human *GLS2* is also proposed on the basis of small-angle X-ray scattering data and cryo-electron microscopy. Collectively, these results contribute to the general knowledge on the many human glutaminase isoforms as well as explain the mechanistic diversity that poses challenges that still must be overcome to

increase the chances of successfully inhibiting the enzyme in a clinical setting.

Results

The multidomain origin of glutaminases

An evolutionary analysis of 2,796 bacterial glutaminase protein sequences and 789 eukaryotic sequences selected from a BLAST search was performed using the glutaminase domain from human KGA (Ile²²¹-Arg⁵⁴⁴) as the query sequence (*E* value ≤ 0.0001). Particularly, no glutaminase homologs were identified in archaea. The bacterial sequence sizes presented three normal distributions. The first and major distribution (~85% of the sequences) was centered at 313 ± 10 amino acids (Fig. 1A), thus suggesting that the proteins predominantly contained only the catalytic domain (24). The second distribution was smaller (10% of the sequences) and centered at 429 ± 16 amino acids. Detailed analysis suggested that this group possesses a sulfate transporter and anti- σ factor antagonist (STAS) domain located C-terminal to the glutaminase domain (Fig. 1A). Finally, 4% (109) of bacterial glutaminases clustered in a third distribution centered at 613 amino acids. These sequences, in addition to the STAS domain, have an extra cyclic nucleotide-binding domain located N-terminal to the glutaminase domain. Notably, three cyanobacteria sequences from this group possess a glutaminase domain flanked by an Eps15 homology-like domain (EH-like) at the N terminus and two clusters of ANK repeats at the C terminus (Fig. 1A). The Eps15 homology domain is a pair of EF-hand motifs that recognize and bind to proteins containing Asn-Pro-Phe (NPF) sequences (25). Aside from these three-domain cyanobacteria sequences, 17 proteo- and actinobacteria sequences situated between the second and third normal distributions (Fig. 1A, *blue oval*) also exhibit a glutaminase domain flanked N-terminal by an EH-like domain and C-terminal by only one cluster of ANK repeats.

Eukaryotic glutaminases, which primarily belong to the kingdoms Animalia and Fungi, are consistently longer and present a single Gaussian size distribution averaging 631 amino acids in length (mode at 615), with a skewed standard deviation of 45 amino acids toward shorter sequences and 26 amino acids toward longer sequences (Fig. 1B). The left-most end of the distribution contained the fungal glutaminases, which are 450 to 500 amino acids long and present a unique architecture, wherein the glutaminase domain is followed by a long C terminus (156 ± 7 amino acids) with an unknown fold (Fig. 1B, *pink bar*). The remaining eukaryotic glutaminases that are longer than 500 amino acids in length mostly belong to the Animalia kingdom and have extended N-terminal sequences of varying lengths (Fig. 1B). The N-terminal region immediately adjacent to the glutaminase domain is more than 40% similar to the EF-hand-like four-helix bundle, which is structurally similar to the EH-like domain found in bacteria. Indeed, the X-ray structures of human GLS containing this domain have an EH-like structure (20).

Putative ANK repeats are predicted for about 550 of the longer eukaryotic glutaminases and are located C-terminal to the glutaminase domain with no exception. Another 76 sequences,

etamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl]ethyl sulfide; BIS-TRIS propane, 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane; ISAC, iterative stable alignment and clustering; PDB, Protein Data Bank; Rh, hydrodynamic radius.

The multidomain architecture of human glutaminases

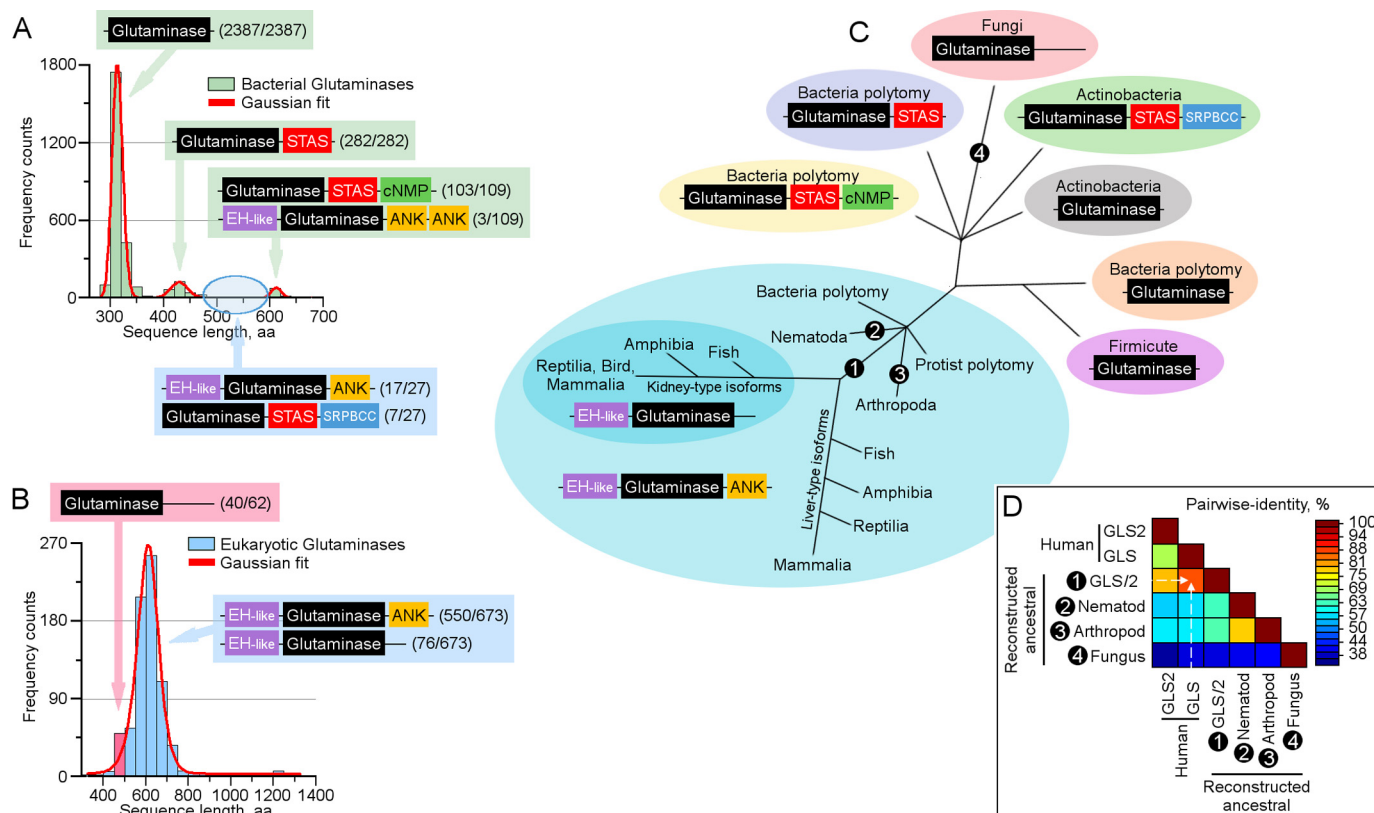


Figure 1. Sequence and architecture analysis of bacterial and eukaryotic glutaminases. The amino acid sequence corresponding to the glutaminase domain of the GLS gene (Ile²²¹-Arg⁵⁴⁴) was used as input of blastp search against the non-redundant protein sequences (nr) database (E value ≤ 0.0001). The sequences obtained were analyzed by number of amino acids (aa); the normal distribution of the sequence length for bacterial and eukaryote glutaminases are, respectively, represented in A and B, with the respective architectures indicated in rectangles; in parentheses, the number of sequences containing the corresponding architecture/the total number of sequences contained in the referred region of the distribution plot. C, cladogram based on architectural organization obtained from a maximum likelihood phylogenetic reconstruction approach. D, the generated phylogenetic tree and respective alignment were used to reconstruct ancestral protein sequences for specific nodes (ancestral chordates (1); nematodes (2); arthropods (3); and fungi (4)) using maximum parsimony. The obtained ancestral sequences were aligned with the human GLS (KGA and GAC) and GLS2 (GAB and LGA) and the sequence similarity displayed as a heatmap of pairwise distances constructed in SDT using MUSCLE alignment. The obtained result suggests that GLS is the most primitive gene, which has been further duplicated to generate GLS2. cNMP, cyclic nucleotide-binding domain; SRPBCC, START/RHO α C/PI3P/Bet v1/CoxG/CalC.

all of mammalian origin, have a shorter C terminus that closely resembles human GAC in sequence (Fig. 1B). Finally, a few glutaminase sequences (11 in total) belonging to the major haptophyte and heterokont lines of eukaryotes were identified. These sequences are much longer, ranging from 800 to 1250 amino acids in length, and the predicted architectures of some of them consist of two complete tandemly associated ANK-containing glutaminases (data not shown).

To detect evolutionary relationships based on the architectural organization, we next reconstructed an unrooted cladogram using the analyzed sequences (Fig. 1C). The derived tree structure has a taxa organization similar to that found in rRNA-based phylogenetic trees (26). Many unresolved nodes (polytomy) were observed, particularly for the bacterial glutaminases. We believe that such observation stems from the fact that many bacterial species possibly have more than one glutaminase, often as a result of the combination of a single protein with a multidomain isozyme. Except for fungal glutaminases, which clustered closer to the bacterial homologs, the eukaryotic proteins had a better-resolved tree. Protists, nematodes, and arthropods form a polytomic group with chordates, as well as with ANK-containing proteo- and cyanobacteria; this grouping suggests that the appearance of this multidomain feature was

an early event, concomitant with the symbiotic association related to the appearance of eukaryotes, because archaea does not carry any glutaminase-like coding gene. A subsequent lineage split linked to the appearance of multiple variations around the same basic architecture (EH-like + glutaminase + ANK) suggests that the gene duplication event that produced the GLS and GLS2 genes and isoform differentiation (with the appearance of GAC-like isoforms; Fig. 1B, dark blue oval) appeared with chordates. However, interestingly, birds have completely lost the GLS2 gene.

Finally, based on a theoretical reconstruction of the ancestral glutaminases from each of the main eukaryotic branches (chordata, arthropods, nematodes, and fungi), the most primitive glutaminase acquired from a bacterial ancestor was most probably the kidney-type glutaminase (KGA-like), as shown in Fig. 1D. The general organization EH-like + glutaminase + ANK is preserved in all four reconstructed ancestral sequences. Comparison of the sequence identity of human genes with the reconstructed common ancestor of GLS and GLS2 from Gnathostomata suggested that GLS was restrained during evolution to maintain the same function, whereas GLS2 exhibited more changes, probably acquiring new functions and/or regulatory mechanisms.

The origin of glutaminase isoforms

Having established a plausible origin for the multidomain architecture of the glutaminases, we next asked how the different variants of the enzyme, currently observed in humans, might have evolved. We first performed a “top-down” search for glutaminase genes in phylum Chordata using the complete genomic sequence of the human *GLS* and *GLS2* genes as templates. Second, we identified regions homologous to exon 14 of *GLS* (after which the *GLS* splicing event occurs) and exon 15 (the “GAC exon”).

In the lower chordates, we verified that the genome of the tunicate sea squirt (27) (*Ciona intestinalis*) has a single *GLS*-like gene containing 12 exons. A region similar to human exon 14 (70% identity, red bar in the tunicate branch, Fig. 2A) is inserted in exon 11. The Cephalochordate amphioxus (28) (*Branchiostoma floridae*) also has a single glutaminase gene, which, interestingly, has only two exons. In this gene, the region homologous to the human exon 14 is appropriately located at the 3' boundary of exon 1; however, no homology to the GAC exon was identified in the downstream sequence. A gene duplication event was observed further upstream in lampreys (29) (*Pekinus marinus*, Hyperortia), which generated distinct sequences related to the human *GLS* and *GLS2* genes.

Next, the Chondrichthyes *Callorhynchus milii* (elephant shark (30)) also has two glutaminases that are phylogenetically related to the *GLS* and *GLS2* genes without annotated splicing regulation. However, in the *GLS* gene, a region homologous to the human GAC exon is for the first time observed and located downstream of an exon 14-equivalent sequence, thereby suggesting an origin for the splicing variant GAC. Zebrafish (*Danio rerio* (31)) and other fish species possess 5 glutaminase genes, thus suggesting subsequent autapomorphic duplication events for both *GLS* and *GLS2*. Interestingly, the GAC isoform was maintained in both copies of the *GLS* gene, thus supporting the hypothesis that the GAC exon appeared before this duplication; a new *GLS*-like (*GLSL*) sequence was identified in species within this branch, such as zebrafish, elephant shark, and others.

Of note, the amphibian *Xenopus tropicalis* (Western clawed frog (32)), with only one copy of both *GLS* and *GLS2*, points to a compaction of the *GLS2* introns and exons against the spread of the *GLS* across a larger genomic region. Finally, the human glutaminase gene structures retained the same architecture observed in the amphibian genes, although the sequence lengths were smaller.

The identification of several transposable elements such as Alu and L2 (Fig. 2B), within the human *GLS* intron 15, strongly suggests that the insertion of the GAC exon was due to an early retrotransposition event; however, no consensus matching elements were found in the rapid evolving intron 14. Nevertheless, a thorough tblastn analysis failed to identify a region homologous to the GAC exon (exon 15) within the human genome, preventing us from proposing an original location for this sequence.

Crystal structures of the human glutaminase ankyrin repeats

We next determined the crystal structures of the ANK-containing C-terminal regions of both human KGA (KGA.ANK: Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹) and GLS2 (GLS2.ANK: Lys⁴⁸⁵-Val⁶⁰²). Both

proteins were subjected to limited proteolysis with trypsin (for KGA.ANK) or chymotrypsin (for GLS2.ANK) during purification to remove the likely intrinsically flexible regions and obtain well diffracting crystals. X-ray diffraction datasets were obtained for KGA.ANK crystals belonging to two different space groups, namely the tetragonal P₄₃2₁2 and a monoclinic P12₁1. Sulfur single-wavelength anomalous dispersion (SAD) phasing was used to produce a higher resolution molecular model (at 1.41 Å maximum) from the tetragonal crystals. The obtained structure was then used as a search model for molecular replacement of the monoclinic crystals, which diffracted up to 1.74-Å maximum resolution. Finally, the structure, which was collected at 2.55-Å maximum resolution, of the GLS2.ANK hexagonal crystals (space group P6₅) was solved by molecular replacement using the KGA.ANK structure. The statistics of the data collection, processing, phasing, and model refinement data for all the structures are shown in Table 1. Because of the high structural similarity observed for both KGA.ANK structures (backbone r.m.s. deviations of 0.4 Å), only the higher resolution model was used for the subsequent detailed analysis and comparison to the GLS2.ANK structure.

Overall, the C-terminal domains of KGA and GLS2 each contain three ANK repeats (labeled ANK1 to ANK3) and are very similar, both in sequence composition (80% identical) and overall structure (r.m.s. deviation of 0.5 Å over 89 equivalent Cα positions; Fig. 3A). The largest structural variation (a shift between 1.3 and 1.8 Å of the Cα atom positions) occurs in the β-hairpin that links ANK1 to ANK2 (β-hairpin 2), whereas the minimal deviations (~0.1 Å) are observed in the inner and outer α-helices of ANK2. The primary sequences of ANK1 and ANK3 repeats in both KGA and GLS2 diverge from the canonical ANK repeats at the TPLH tetrapeptide motif, which is located at the beginning of the inner α-helices and is responsible for the stabilization of ANK repeats through reciprocal hydrogen bonding between the threonine hydroxyl and histidine imidazole groups (33, 34) (Fig. 3B). The ANK1 inner helix of both KGA and GLS2 is a half-turn longer and lacks the β1 turn compared with the typical inner helix observed in ANK repeats (Fig. 3B), whereas in the ANK3 inner helix, the histidine is replaced with an aspartate, thus preventing the formation of the conserved hydroxyl-imidazole hydrogen bond. Moreover, in both structures, ANK2 contains an extra residue, a surface-exposed lysine (Lys⁶¹¹ at KGA and Lys⁵⁴³ at GLS2, indicated by a plus sign in Fig. 3B), at the C terminus of the outer helix. Finally, the GLS2 ANK3 outer helix is one turn longer than the canonical ANK repeats (Fig. 3B).

Glutaminase ankyrin repeats assemble into atypical dimers

A search for the biologically relevant assembly of the KGA and GLS2 ANK domains was performed using the PISA (protein interfaces, surfaces and assemblies) server (35). The program identified a thermodynamically stable interface involving a crystallographic homodimer, with a solvation free energy gain of -5.4 kcal/M upon formation (Fig. 3C). The identified interface occludes an area of 800 Å² and corresponds to a symmetric groove-to-groove interaction in both structures. Twelve hydrogen bonds and 12 salt bridges are formed between the short loops present in the β-hairpins 1 (linking ANK1 to ANK2) and

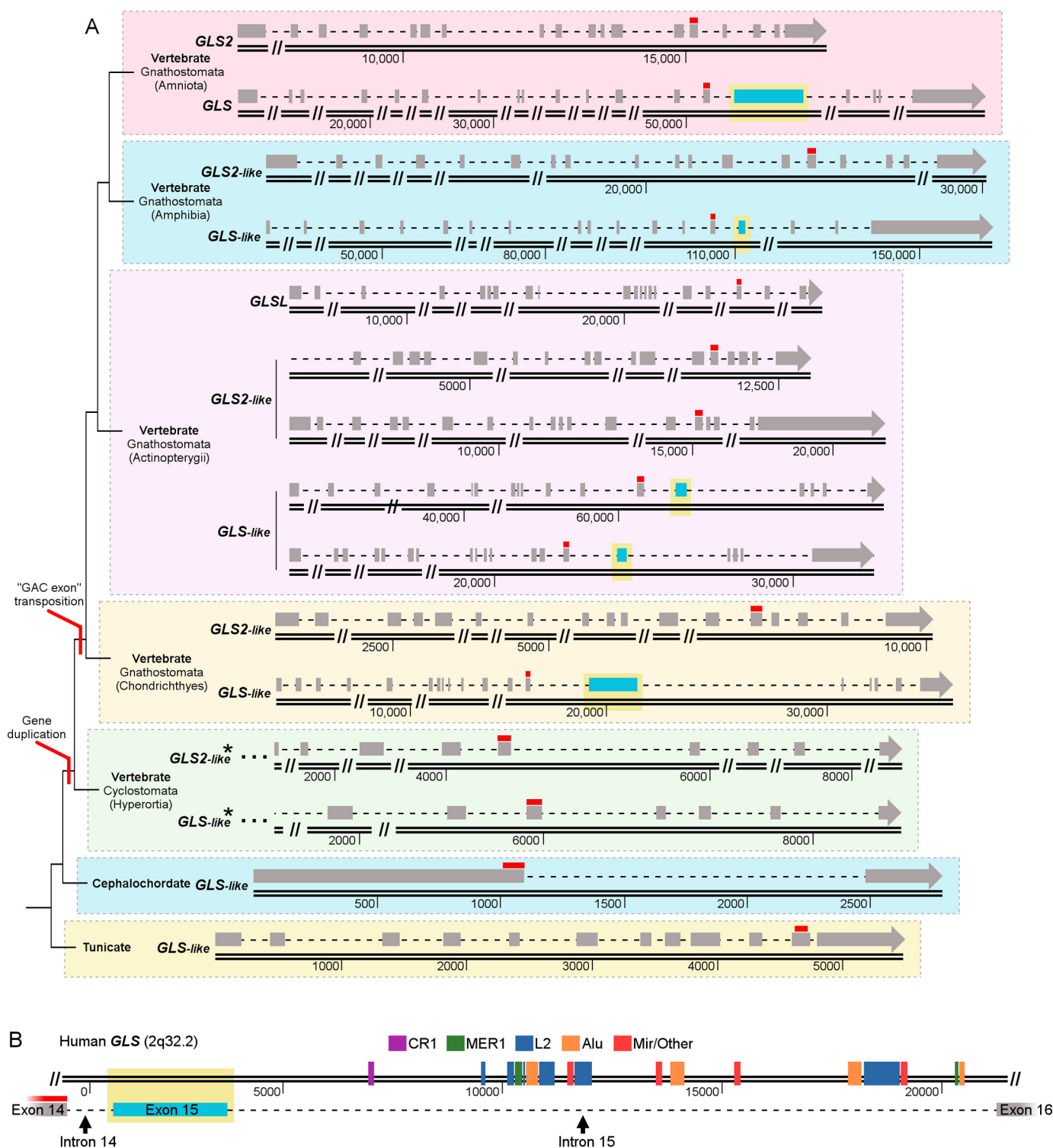


Figure 2. Evolution of glutaminase intron-exon structure. A, protein sequence corresponding to human *GLS* exon 14 was used as a query of translated blast (tblastn) searches against available genomes from *C. intestinalis* (Tunicate), *B. floridae* (Cephalochordate), *P. marinus* (Cyclostomata), *C. milii* (Chondrichthyes), *D. rerio* (Actinopterygii), and *X. tropicalis* (Amphibia). After an initial Reciprocal Best Hit region was found, the correct position of the exon was determined by pairwise LALIGN between sequences. Region downstream genomic sequence homologous to exon 14 were also evaluated by LALIGN against human GAC-exclusive exon (exon 15). As both *P. marinus* glutaminases are incomplete, available exons were found in contig using LALIGN approach. The human genes are represented at the top branch (Amniota). The thin red bars represent the homologous region to the *GLS* exon 14 and the light blue boxes indicate homologous regions to the exon 15 of human *GLS*. The introns, represented as dashed lines, are not drawn to scale and the omitted sections are indicated by two bars (//). The asterisk (*) indicates that the deposited sequences are incomplete. B, a search for retrotransposition evidences in the genomic region comprehending exon 15 and introns 14 and 15 of human *GLS* using TranspoGene resulted in the identification of various transposable elements in the intron 15; however, no consensus matching elements were found in the intron 14.

Table 1**X-ray crystallography data collection parameters and structure refinement statistics**

Data for the outer shell are shown in parentheses.

Data collection and processing				
Beamline	12–2 at SSRL, USA	12–2 at SSRL, USA	12–2 at SSRL, USA	I03 at DLS, UK
Wavelength (Å)	0.9795	0.9795	0.9795	0.9762
Space group	P 43 21 2	P 1 21 1	P 65	P 42 21 2
Cell parameters (Å)	$a = b = 75.3, c = 88.3$	$a = 76.5, b = 47.2, c = 115.7$ ($\beta = 90.1^\circ$)	$a = b = 85.2, c = 336.8$	$a = b = 144.1, c = 615.2$
Resolution range (Å)	75.0 – 1.42 (1.45 – 1.42)	64.0 – 1.72 (1.75 – 1.72)	84.0 – 2.55 (2.64 – 2.55)	50.0 – 3.6 (3.67 – 3.60)
Unique reflections	48,262 (2,342)	82,659 (4,303)	45,005 (4,413)	76,934 (4,463)
Multiplicity	22.7 (23.2)	6.4 (6.3)	8.1 (8.1)	23.4 (20.8)
R_{pim} (%)	2.6 (30.9)	2.4 (31.8)	3.5 (25.2)	7.4 (49.4)
CC (%)	0.994 (0.441)	0.999 (0.902)	0.999 (0.860)	0.998 (0.716)
Completeness (%)	100 (100)	94.1 (92.1)	99.9 (99.8)	100 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	17.1 (2.9)	15.7 (2.1)	14.1 (3.4)	8.8 (1.9)
Average mosaicity ($^\circ$)	0.62	0.55	0.49	0.30
Wilson B-factor (\AA^2)	13.6	25.7	48.5	104.6
Monomers/AU	2	4*	10	5
Solvent content (%)	46.7	36.4*	53.0	77.1
Matthews coefficient ($\text{\AA}^3 \text{ Da}^{-1}$)	2.32	1.93*	2.62	5.37
Model refinement				
Resolution range (Å)	57.3 – 1.42	64.0 – 1.72	73.8 – 2.55	50.0 – 3.6
Test set reflections (%)	2500 (5.2)	4285 (5.2)	2366 (5.3)	7160 (5.0)
$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ (%)	14.4/17.9	18.3/22.2	21.8/25.7	27.4/31.2
Clashscore	2	2	5	3
Side chain outliers (%)	0.6	0.7	2.4	2.6
RSRZ outliers (%)	1.6	0.6	2.8	5.7
Average B, all atoms (\AA^2)	22.0	34.0	53.0	137.0
Number of protein atoms	1,506	2,943	6,860	18,905
Solvent molecules	285	640	110	
Inorganic atoms	1 Cl [−] , 3 Na ⁺	6 Na ⁺		
Ligand molecules				3 BPTES
R.m.s. deviations from standard geometry				
Bond length (Å)	0.015	0.019	0.002	0.003
Bond angles ($^\circ$)	1.313	1.454	0.479	0.566
Ramachandran plot (%)				
Most favorable	98.0	98.6	95.9	87.5
Outliers	0	0	0.2	2.1
PDB ID	5u0i	5u0j	5u0k	5uqe

* Translational non-crystallographic symmetry was detected for this dataset.

2 (linking ANK2 to ANK3, Fig. 3B) in chain A with their respective equivalents in chain B (Fig. 3C, *left panel*, for β -hairpin 1 loop interactions and *right panel* for β -hairpin 2 loop interactions). The short loops of β -hairpins 1 and 2 contain the motifs Asp-Tyr-Asp (DYD, residues 583–585 in KGA and 516–518 in GLS2) and Asp-Arg-Trp (DRW, residues 617–619 in KGA and 550–552 in GLS2), respectively (Fig. 3C). Despite the overall relatively low sequence identity of the eukaryotic and bacterial glutaminase ANK repeats, both the DYD and DRW motifs are highly conserved (Fig. 3, D and E, respectively). Finally, additional polar interactions are observed between the β -hairpin 1 loop and the ANK3 inner helix and between the β -hairpin 2 loop and the ANK2 inner helix, complementing the identified symmetrical interface (data not shown).

Crystal structure of full-length human KGA

In addition to the determination of the crystal structures of the isolated C-terminal ANK dimers, we also solved the novel crystal structure of KGA containing the C terminus, which was bound to the inhibitor bis-2[5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl]ethyl sulfide (BPTES) (36). The diffraction dataset was collected at a 3.6-Å maximum resolution (space group P4₂2₁2) with lengthy cell parameters and a high solvent content of ~78% (Table 1). Phasing was achieved by molecular replacement using the coordinates of the previously solved N-terminal and glutaminase domains from GAC bound to BPTES (PDB code 4jkt) and the KGA.ANK dimer described here as

search models. The P4₂2₁2 asymmetric unit contains five KGA monomers; accordingly, one canonical tetramer (a dimer of dimers) is formed within the asymmetric unit by four monomers and, the fifth monomer is related to another tetramer by the crystal 2-fold screw axis. The final model obtained (Fig. 4A) was refined to R_{factor} and R_{free} of 27.3 and 31.8%, respectively.

The ANK dimers in the KGA structure (*green surface* in Fig. 4B) are spatially located between the N-terminal EF-hand-like domains (*blue surfaces* in Fig. 4B). Notably, both ANK dimers of a tetramer lie on the same side of a sectional plane defined by the two longest axes of the protein (Fig. 4B), breaking the previously established 2-fold dihedral symmetry of the glutaminase structures lacking the C terminus (20).

The low-resolution model did not allow us to provide a detailed description of the side chain interactions between the ANK dimers and the N-terminal domain. However, the close contact between the ANK1 outer helix of chain A with the EF-hand-like domain helix H1 of chain B is unmistakable (Fig. 4C). The interface contains large, exposed polar residues, such as glutamic acid and arginine, which are likely to be responsible for the contact. An equivalent arrangement was also observed for the ANK1 outer helix of chain C with the EF-hand-like domain helix H1 of chain D (data not shown). The majority of the C-terminal region of KGA adjacent to the ANK repeats (residues Thr⁶⁴⁷-Leu⁶⁶⁹) is likely heterogeneous in conforma-

The multidomain architecture of human glutaminases

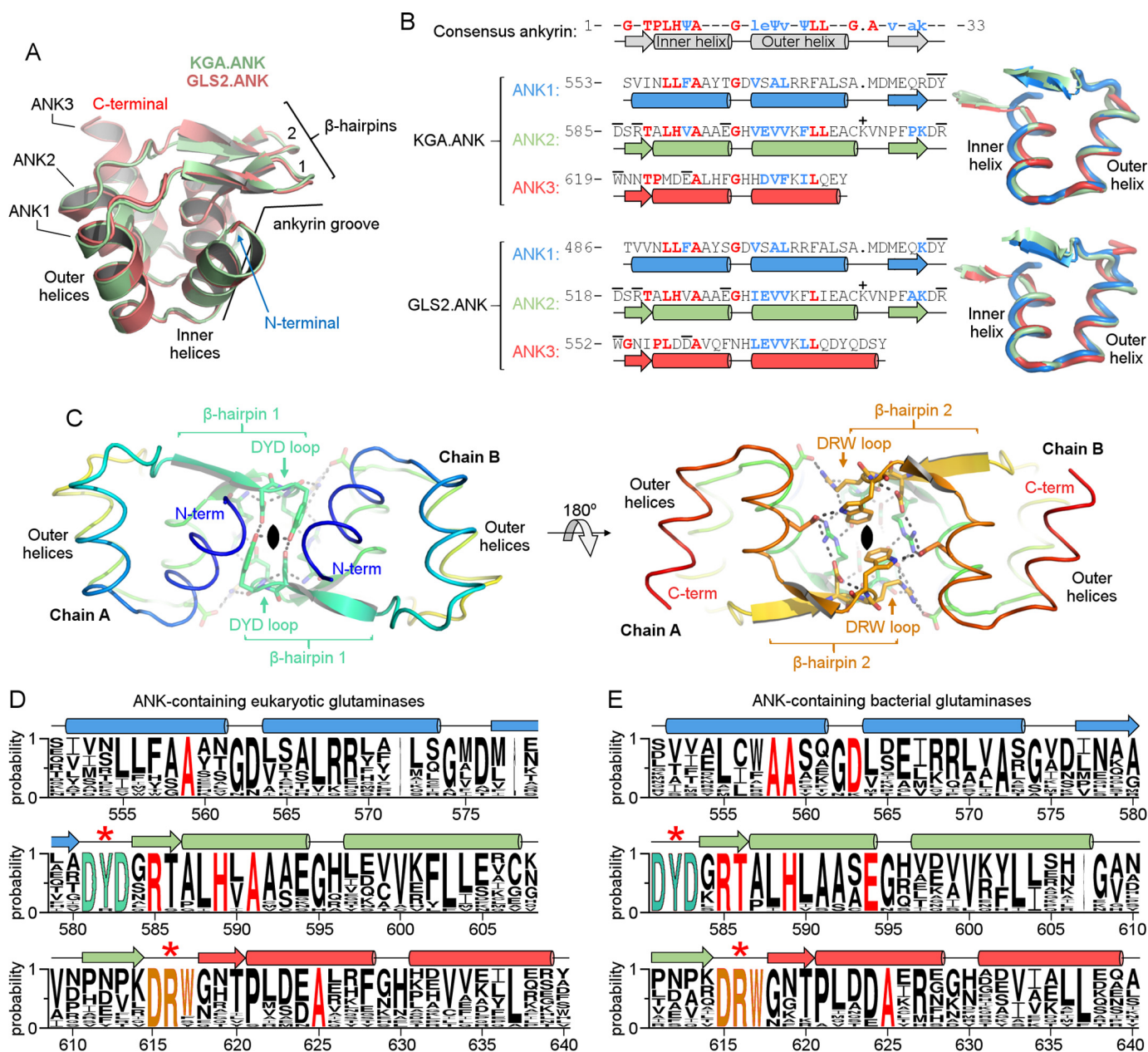
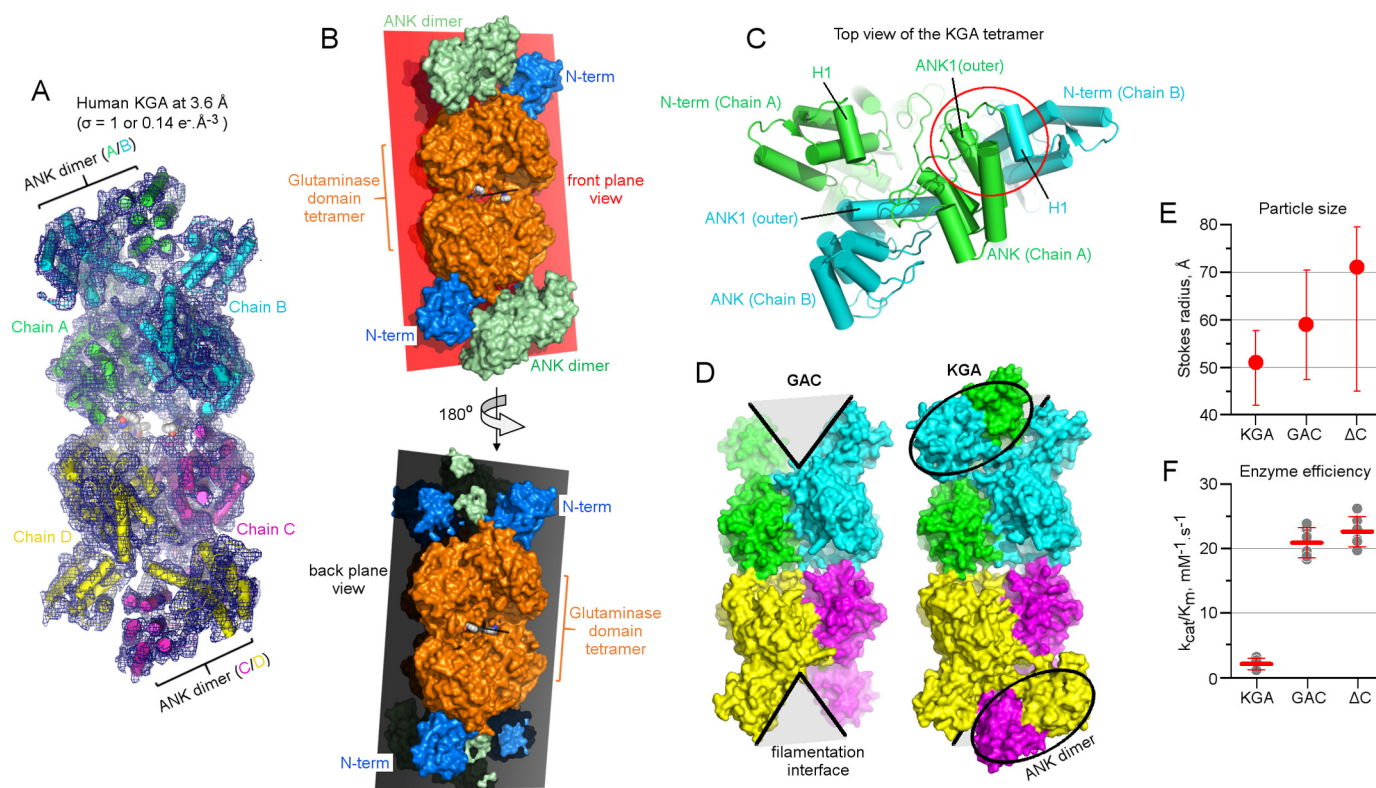


Figure 3. Overall structural features of ANK domain of glutaminases. A, schematic representation of three ANK repeats (ANK1 to ANK3) present as a C-terminal domain of KGA and GLS2. Both ANK repeats are very similar in sequence as well as in the overall structure. B, alignment of the glutaminase ANK repeats and the consensus sequence (shown on top), proposed in Ref. 39. Highly conserved residues are capitalized and in red, semiconserved residues are colored cyan and not capitalized. Residues involved in the dimer interface are indicated by a bar. ANK2 in both KGA and GLS2 contains an extra surface-exposed lysine, which is indicated by the + signal. On the right, the superposition of ANK1, ANK2, and ANK3 is represented. C, dimer interface and associated interaction motifs (DYG and DRW). The side chains of the motifs DYG (left) and DRW (right) are represented in sticks. D, representation of sequence conservation of glutaminase ANK from eukaryotes and E, bacteria. The size of the letters is proportional to the degree of conservation of residues. The motifs DYG and DRW are highlighted. The residues in red show the 100% conservation throughout the alignment. Residues are numbered according to human KGA.

tion and therefore could not be modeled. According to secondary structure predictions by the JPred4 server (37), this region is mostly unstructured. This information, added to the fact that such region is present in a KEN box involved on KGA degradation (8), suggest that this segment is likely functionally independent from the ankyrin domain.

As shown in our previous study (23), the phosphate-dependent enzymatic activity of the GLS isoforms is directly related to their ability of self-assembling into supra-tetrameric helical filaments; GAC is the most active isoform and forms longer filaments. Moreover, we previously demonstrated that this

assembly was generated by end-to-end associations via the N-terminal domains; the KGA assembly was always shorter, although it formed the same structure. Based on the KGA crystal structure presented here, we hypothesized that the ANK repeats located between the N-terminal domains prevent KGA from forming longer higher active filaments due to the fact that it destabilizes the polymerization. More specifically, the ANK dimers limit the association of the KGA tetramers into long polymers (23) because they limit the formation and availability of the filamentation interface (Fig. 4D). This interface is the groove region by which the single strand filaments of the GAC



isoform grows indefinitely, via end to end interaction between pairs of N-terminal domains (23).

To further confirm this hypothesis, we generated a C terminally truncated GLS construct containing the common sequence between KGA and GAC (N terminus and glutaminase domains, called ΔC), but lacking the ANK repeats. Accordingly, the construct had a larger Stokes radius in comparison to KGA and GAC and was more heterogeneous in size (Fig. 4E). Moreover, as expected, the ΔC construct was as active as GAC, possibly due to its increased ability to form extended filaments (Fig. 4F).

Low resolution structure of GLS2

Last, the availability of the crystal structure of individual domains of GAB/LGA, such as the C-terminal ANK dimers reported here and the glutaminase domain tetramer (PDB code 4bqm), allowed for a proposition of the full-length structure based on small-angle X-ray scattering data (Fig. 5, A and B) for the multidomain portion common to both isoforms. The C-terminal ANK domains are expected to be spatially located between the N-terminal domains, in an organization similar to that observed for KGA. Consequently, this protein is also expected not to assemble in filament-like higher order oligomers, being stable at the tetramer form. This has been previously observed by our group (23) and is here corroborated by measurements on cryo-electron microscopy images (Fig. 5C).

Discussion

The human genome has two copies of glutaminase-coding genes, which are known to produce at least four isoforms through alternative splicing or transcription at alternative initiation sites (4). Genetic evolutionary models often predict an increase in the gene copy number prior to the specialization or gain of new functions, with a momentary intermediate state of specialization with an overlap of functions (38). In addition, this apparent redundancy in glutaminase isoforms can be explained by differential tissue expression patterns, as well as the cell proliferation state. In this regard, KGA is expressed in kidney tubule epithelial cells, in which ammonia production is key to renal acid-base regulation (16); LGA is expressed in periportal hepatocytes, where it participates in urea synthesis (17). In addition, although GAC meets the glutamine-dependent metabolic demands of several types of cancer (20), GAB has tumor-suppressing activity in hepatocarcinomas and gliomas (40).

Despite this functional diversity, the human glutaminase isoforms converge into a conserved multidomain structure. Based on a combination of computational predictions and experimental evidence mainly produced by X-ray crystallography studies, we found that all four isoforms contain an N-terminal EF-hand-like domain, followed by a glutaminase domain in the middle and three ANK repeats at the C terminus. The only exception is GAC, in which the C terminus is a short

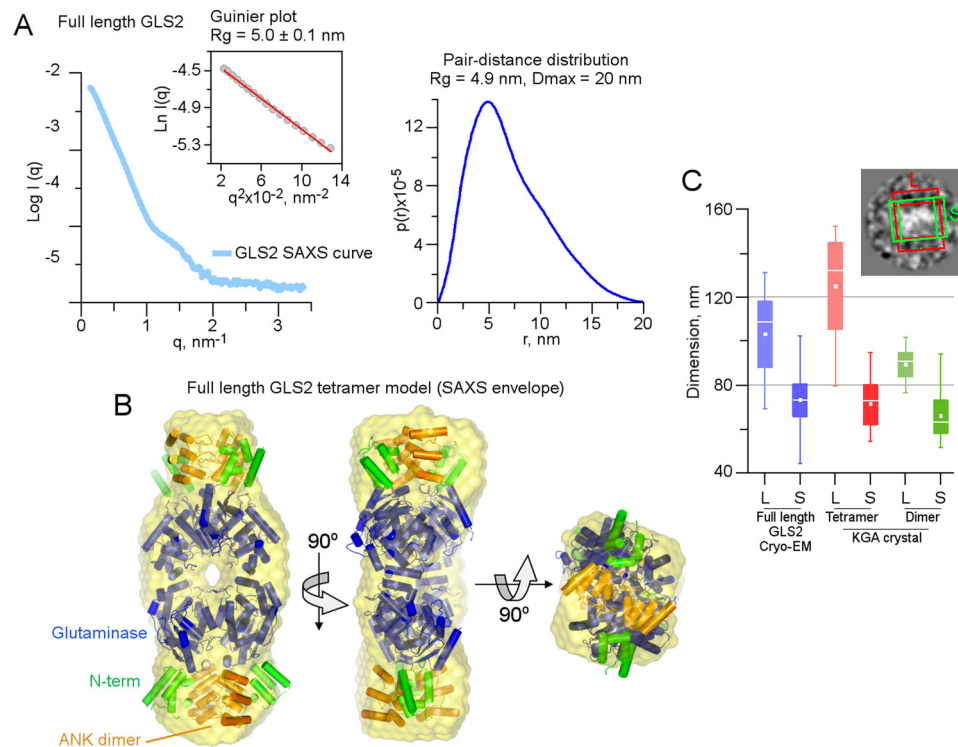


Figure 5. Low-resolution solution model for full-length GLS2 (GAB/LGA). Intensity (left panel) and pair-distance (right panel) distribution functions, obtained for GAB/LGA subject to SAXS experiments. *B*, orthogonal views of the superposition between the SAXS envelope and the collection of X-ray crystal structures from GLS2 glutaminase domain (PDB code 4BQM), N-terminal portion of human GLS (PDB code 3CZD) and GAB/LGA.ANK. *C*, box plot of the two perpendicular dimensions for GAB/LGA, large (L) and short (S) as taken from the cryo-EM micrographs (inset). KGA dimer and tetramer crystal structures projections were used as a reference for the dimensions of these two oligomeric states.

unstructured region, because of alternative splicing of the *GLS* gene.

In this work, the multidomain architecture was shown to be shared by all chordates, including fishes, reptiles, birds, and amphibians, as well as by arthropods and nematodes. By surveying the database-deposited glutaminase protein sequences, we observed similar organizational characteristics in free-living proteo- and cyanobacteria, but not fungi. From our data, we propose that the multidomain glutaminase structure has a very ancient origin. In addition, we verified that multiple *GLS* genes and isoforms are present in a wide range of vertebrates. By further analyzing the genomes of representative species of the phylum Chordata, we were able to identify early events of exon repositioning among tunicates and cephalochordates, followed by gene duplication in Hyperoartia and exon retrotransposition in Chondrichthyes, concomitant with the change from a simple kidney structure pronephros to a more complex mesonephros with tubules (41). Together, all these features are likely the basis of the isozyme diversity observed in vertebrates. We also identified a glutaminase ancestor that was more similar to the human kidney-type glutaminase and gave rise to the liver-type glutaminase, whereas the appearance of GAC-like glutaminases, with shorter C termini, was a late event in glutaminase evolution. GAC is the most active isoform compared with KGA and LGA, a feature linked to its capacity to assemble into long filament-like superstructures (23). In the present study, we found that this feature is possible only because GAC lacks the original C-terminal bulky ANK repeats of parental KGA, because the Δ C-terminal construct assembles in longer fila-

ments and is as active as GAC. Therefore, we propose that filament formation is a gain-of-function characteristic of vertebrate glutaminases, which has been positively selected to create a more active enzyme due to the substrate channeling effect.

Our group and others have previously published the structure of the N-terminal EF-hand-like and glutaminase domains of GLS (20, 42), but the structure of the C-terminal ANK repeats remained unsolved. Here, we provide novel crystal structures for the ANK domains of KGA and GLS2, which surprisingly form an atypical dimer. ANK repeats usually mediate the interaction of a protein with a different partner. However, KGA.ANK and GLS2.ANK mediated the formation of homooligomers, a rare feature. A survey of structures in the Protein Data Bank revealed 68 unique crystal structures of ANK-containing proteins, containing between 2 to 24 ANK repeats (supplemental Table S1). Of these crystal structures, only 5 displayed an ANK-to-ANK association (supplemental Fig. S1). However, none contained an interface that resembles the glutaminase ANK dimer (contact between the DYD and DRW motifs). Therefore, we propose that the ANK dimer association described here is structurally unique to glutaminases and was selected as a conserved feature throughout glutaminase evolution. The explanation for this positive selection remains elusive.

The short regions located immediately after the ANK repeats in KGA and GLS2 (KEN and ESMV motif, respectively) are involved in E3 ubiquitin ligase-dependent degradation (8) and direct interactions with PDZ domain-containing proteins (43), respectively. An analysis of protein complexes including ANK-containing proteins and their interaction partners (44–47)

showed that most of the contacts necessary for ANK-to-ANK interaction involves the ANK groove (the concave surface). Although most of the known cases involve the concave surface, some ANK repeats mediate protein-protein contacts through the convex face. One example is the human oncoprotein g-ankyrin, which was crystallized in complex with an antibody fragment. In this structure, the interaction occurred through the outer α -helices of the ANK4-ANK6 repeats (48). The vaccinia virus K1 protein consists entirely of ANK repeats that are involved in interactions mediated by the convex surface (49). In addition, the VPS9-domain ANK repeat protein binds to Rab32 through the convex side of its ANK repeat (50).

In this regard, although the concave faces of the ANK repeats of KGA and GLS2 make contacts within the glutaminase, we predict that the ANK repeats may still mediate protein-protein interactions through the convex surface. Recently, GAB has been shown to bind and inhibit the small GTPase Rac1 by preventing its interaction with a guanine-nucleotide exchange factor, an interaction that involves the C terminus of GLS2 (residues 464 to 602) (40). Because the region contains the ANK repeats of GAB, we predict that the contact involves the ANK concave face. Considering the long list of partners that were shown to interact with glutaminases using mass spectrometry-based approaches (51), further investigations are required to confirm the mechanism by which the ANK repeats in glutaminases mediate protein-protein interactions.

Last, although at low resolution, the novel ANK-containing structure of human KGA confirms our previous hypothesis that the long-range propagation of filaments for this isoform was thwarted by the presence of the ankyrin repeats themselves (23). As observed in the crystallographic model, the ANK dimer occludes the formation of the filamentation groove, by which the single strand filament of the GAC isoform grows indefinitely, via end to end interaction between pairs of N-terminal domains. Because GAC possesses a shorter unstructured C-terminal sequence, this hypothesis is confirmed when the ANK domain is completely deleted in a mutant construct, which can form longer polymeric species, and therefore, resulting in a more active protein.

Experimental procedures

Phylogenetic reconstruction

726 Glutaminase protein sequences obtained from GenBankTM (52), by performing a BLAST search with human glutaminase domain sequence from GLS as the query, were aligned using kalign (53). Maximum likelihood phylogenetic reconstruction was performed with RaxML (54) with 260 bootstrap pseudoreplicates and using automated model search. Replicates were summarized with sumtrees from DendroPy (55). The generated phylogenetic tree and respective alignment were used to reconstruct ancestral states for specific nodes using maximum parsimony, as implemented in phangorn (56). Heatmaps from pairwise distances were constructed in SDT (57) using MUSCLE (58) alignment.

Evolution of glutaminase exon structure

Protein sequence corresponding to human GLS exon 14 was used as input of translated blast (tblastn) searches against avail-

able genomes from *C. intestinalis* (27), *B. floridae* (28), *P. marinus* (29), *C. milii* (30), *D. rerio* (31), and *X. tropicalis* (32). After an initial Reciprocal Best Hit (59) region was found, the correct position of the exon was determined by pairwise LALIGN between sequences (60). Regions downstream from the genomic sequence homologous to exon 14 were also evaluated by LALIGN against human GAC-exclusive exon (exon 15). As both *P. marinus* glutaminases are incomplete, available exons were found in contig using the LALIGN approach. The GLS region comprising intron 14, exon 15, and intron 15 was used as input of TranspoGene (61) retrotransposon searching.

Protein expression and purification

The constructs of human KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹ and Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹ were amplified from the pcDNA3.1/hKGA-V5 clone, kindly provided by Dr. Richard Cerione (Cornell University, Ithaca, NY), and subcloned into the pET28a plasmid (Novagen) using the NdeI and XhoI restriction sites with N-terminal His₆ tag. KGA Val¹²⁴-Arg⁵⁵⁰ was generated from the pET28a KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹ construct by site-directed mutagenesis of the Val⁵⁵¹ residue into a stop codon (TAA) using the QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). The construct of human GAB Lys⁴⁸⁵-Val⁶⁰² was cloned into pNIC28-Bsa4 plasmid. The construct of GAC Met¹²⁸-Ser⁶⁰³ was amplified from a mouse fetal brain tissue cDNA library and cloned into the pET28a plasmid. The four constructs were transformed into *Escherichia coli* Rosetta-2 thermocompetent cells (Merck). Overnight cultures, grown in LB medium in the presence of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of chloramphenicol, were inoculated in a ratio of 1:100 in 3-liter cultures supplemented with the same antibiotics and left shaking at 200 rpm for 5 h at 37 °C. The cultures were then down-tempered to 18 °C for 1 h before induction with 200 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside for 16 h at 18 °C. Cells were collected by rapid centrifugation and resuspended in 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.5 (or 50 mM HEPES, pH 7.5, for GAB construct), 10% glycerol, and 2 mM β -mercaptoethanol and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Cell lysis was performed chemically, by incubation with hen egg white lysozyme, DNase I, and deoxycholate (all three reagents from Sigma) for about 1 h, incubated on ice. The soluble fractions were separated from the debris by high speed centrifugation and subsequently loaded, by gravity and in a cold room, on immobilized metal affinity column, Co²⁺-charged TALON (Clontech) for the GLS constructs and nickel-nitrilotriacetic acid Superflow (Qiagen) for the GAB construct, previously equilibrated with the running buffer 10 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, HEPES, pH 7.5. The constructs were eluted stepwise using running buffer to which up to 500 mM imidazole (v/v) had been added. For the GLS constructs, the tag was removed by overnight digestion with bovine thrombin (Sigma) and the samples loaded into a HiTrap Q HP anion exchange chromatography column (GE Healthcare). Elution was done by performing a linear gradient with a buffer containing 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, and 2 mM β -mercaptoethanol. The fractions containing the GLS constructs were loaded in a HiLoad 16/600 Superdex 200 (for KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹, KGA Val¹²⁴-Arg⁵⁵⁰, and GAC Met¹²⁸-Ser⁶⁰³ constructs) or 75 pg (GE

The multidomain architecture of human glutaminases

Healthcare) (for KGA Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹). The final buffer conditions were 150 mM NaCl, 30 mM HEPES, pH 8, and 0.5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine). For the GAB construct, the eluate from the affinity chromatography was directly loaded in a HiLoad 16/600 75 pg. Protein concentration was determined by UV 280 nm using calculated extinction coefficients. The hydrodynamic parameters (Stokes radii, R_h) of human KGA, GAC, and the deletion mutant ΔC were determined by gel filtration chromatography using a prepacked Superdex 200 HR 10/30 column (GE Healthcare) in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine). For each purified protein, ~ 1 mg ml⁻¹ concentration in a 500- μ l volume was injected into the column. To induce the formation of the higher-order oligomeric species, 20 mM K₂HPO₄ as a final concentration was added in the protein solution before loading it onto the column. The gel filtration buffer was also supplemented with 20 mM K₂HPO₄. The flow rate was maintained at 0.5 ml min⁻¹. To establish the hydrodynamic radius (R_h) and elution volume relationship of the protein, proteins of known R_h were run on the same column. The proteins used as standards were ferritin (440 kDa, R_h = 60.8 Å), aldolase (158 kDa, R_h = 48.1 Å), conalbumin (75 kDa, R_h = 36.4 Å), ovalbumin (44 kDa, R_h = 30.5 Å), and ribonuclease A (13.7 kDa, R_h = 15.9 Å).

Crystallization

Following size-exclusion purification, KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹ was concentrated using an Amicon 30-kDa cutoff concentrator (Millipore) to a final concentration of ~ 7.5 mg ml⁻¹. Crystallization experiments were performed at 277 K using the conventional sitting drop vapor diffusion technique. Drops were made by mixing two parts of protein previously incubated with 1.2 mM BPTES to one part of the well solution, containing 1.8 M sodium formate, 0.5 M NaCl, and 0.1 M BIS-TRIS propane, pH 6.8. Before data collection at cryogenic temperature (100 K), harvested crystals were cryoprotected with 10% ethylene glycol added to the mother liquor.

For large-scale limited proteolysis, KGA Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹ after a size-exclusion purification step was incubated with 1:100 trypsin (Sigma) at 23 °C for 20 min. The proteolysis was stopped by the addition of 1.5 mM PMSF. For limited proteolysis of GAB Lys⁴⁸⁵-Val⁶⁰², purified protein was incubated overnight with 1:1000 α -chymotrypsin at 23 °C. The digested fragments were immediately purified by size-exclusion chromatography. For crystallization trials, digested KGA Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹ and GAB Lys⁴⁸⁵-Val⁶⁰² were concentrated, respectively, to 25 and 50 mg ml⁻¹ using Amicon 10-kDa cutoff concentrators.

Both constructs were crystallized by sitting drop vapor diffusion, by mixing equal parts of protein solution and mother liquor. KGA Val⁵⁵¹-Leu⁶⁶⁹ crystals were grown in (a) 3.2 M NaCl, 0.1 M Tris, pH 8.5 and (b) 3.8 M NH₄Cl, 0.1 M BIS-TRIS propane, pH 7. GAB Lys⁴⁸⁵-Val⁶⁰² crystals were grown in 1.1 M trisodium citrate, 0.1 M imidazole, pH 8, 20 mM L-glutamine.

X-ray crystallography

Diffraction data were collected at beamlines I03 at the Diamond Light Source (UK) and 12-2 at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, respectively, for KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹ and

for KGA/GAB ANK crystals. Datasets were integrated using Mosflm (62) (for native datasets) and XDS (63) (for sulfur-SAD dataset) and scaled with Aimless (64). The first set of phases of KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹ was obtained by the molecular replacement technique as implemented in the program Phaser (65), using the coordinates of the mouse GAC isoform (PDB code 3SS3). KGA ANK was solved by sulfur-SAD using SHELX (66) and the model was refined using higher resolution native datasets. The model obtained for KGA was employed as a search model for solving the GAB ANK structure by molecular replacement (Table 1). Positional and B -factor refinement cycles, as well as solvent modeling, were performed with Refmac (67) and Phenix (68), followed by visual inspection using COOT (69).

Glutaminase activity assay

To obtain the kinetic parameters for KGA Val¹²⁴-Leu⁶⁶⁹, KGA Val¹²⁴-Arg⁵⁵⁰, and GAC Met¹²⁸-Ser⁶⁰³, a mixture containing 10 nM glutaminase, 50 mM Tris acetate, pH 8.6, 3 units of bovine L-glutamate dehydrogenase (Sigma), 2 mM NAD (Sigma) was pipetted into 96-well plates previously filled with 6 or 12 serial dilutions of L-glutamine, to achieve a range of concentrations from 60 to 0.15 mM. K₂HPO₄ (2 M stock, pH 9.4) was added to the mixture at a final concentration of 20 mM. The formation of NADH was tracked by absorbance readings at 340 nm, for up to five consecutive minutes, at room temperature. Measurements were done in triplicate. The initial velocities, in picomoles of NADH produced per second, were calculated using an extinction coefficient for NADH of 6,220 M⁻¹ cm⁻¹ at 340 nm and 0.5 cm of path length. The total volume per reaction was 200 μ l. Plate-reader used was an EnSpire (PerkinElmer Life Sciences). Measurements were done in triplicates and analyzed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Small-angle X-ray scattering

Scattering data were collected at λ = 1.488 Å, for sample-detector distances of 1.1 m covering the momentum transfer ranges $0.015 < s < 0.442$ Å⁻¹ ($s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle). The data were normalized to the intensity of the incident beam and corrected for the detector response using an in-house program. Two frames of 250 s were collected and compared for radiation damage using the program PRIMUS (70). The same program was used to average the frames and subtract the buffer. The different protein concentrations were evaluated for aggregation by following increases in the measured R_g (radius of gyration) as calculated by auto R_g . The R_g was confirmed by using the indirect Fourier transform program GNOM (71), which was also used to calculate the distribution function $P(r)$ and D_{\max} . The data were analyzed and processed, including *ab initio* construction and model averaging, using the programs contained in the ATSAS package (72).

Cryo-electron microscopy

For visualization of cryogrids, purified GAB samples were frozen onto a Gatan 626 sample holder, prepared with FEI Vitro-robot Mark II (force of -5 for 2s). Images were acquired using a JEM 2100 (200 kV) electron microscope with a LaB6 filament Gatan 4k \times 4k slow scan CCD camera (US4000). Exposure time

was 1 s/frame, with a dose of $20 \text{ e} \text{ \AA}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The micrographs were processed using IMAGIC (73) and EMAN 2.1 (74). Iterative stable alignment and clustering (ISAC) (75) was used to generate reference-free class-averages from both the IMAGIC stack (25,000 particles) and the EMAN2.1 stack (33,608 particles). Using IMAGIC and UCSF Chimera (76), 10,000 projection images in random orientations of the GAC crystallographic model (PDB code 3SS3) were generated, in both dimer and tetramer configurations. The bounding rectangle dimensions of 200 particles randomly extracted from the IMAGIC, EMAN2.1, ISAC/IMAGIC, and ISAC/EMAN2.1 datasets (50 from each) were classified according to longer (L) and shorter (S) dimensions. Images were low-pass filtered to reduce noise. Only the particles contained in the 50 “best” class averages generated by each program were considered (total: 200 particles). Measurements were performed in Digital Micrograph based on the integration profile across each perpendicular direction, as shown in Fig. 5C. Measurements were taken as the distance, in pixels, between the valleys confining the particle signal. For comparison, we also measured 200 randomly selected projections of the GAC atomic model in dimer and also in tetramer configuration.

Author contributions—S. M. G. D. and A. L. B. A. conceived and initiated the research; C. C. P., Z. I., D. A., I. M. F., R. D. R., J. B., R. V. P., and A. G. conducted the research; all authors analyzed and discussed the data; C. C. P., Z. I., D. A., S. M. G. D., and A. L. B. A. wrote the manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

Acknowledgments—We thank LNBio for accessibility to core facilities as well as for financial support. We are very grateful to Dr. Alessandra Girasole for expert technical support. We thank the Biotechnology group at the SGC Oxford for cloning and expression testing of glutaminase constructs. We thank Dr. Artur T. Cordeiro and Américo T. Ranzani for help with crystallographic data collection. We thank Dr. Wah Chiu for access to the cryo-electron microscopy facility at Baylor College of Medicine. We acknowledge the staff of all the beamlines used in this work. The KGA.ANK and GLS2.ANK data were collected during the RapiData 2015 Course for Data Collection and Structure Solving. Use of the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, is supported by the United States Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. DE-AC02-76SF00515. The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by the DOE Office of Biological and Environmental Research, and National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences Grant P41GM103393.

References

- Bergström, J., Fürst, P., Norée, L. O., and Vinnars, E. (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.* **36**, 693–697
- DeBerardinis, R. J., and Cheng, T. (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313–324
- Levine, A. J., and Puzio-Kuter, A. M. (2010) The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* **330**, 1340–1344
- Altman, B. J., Stine, Z. E., and Dang, C. V. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 619–634
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B., and Thompson, C. B. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18782–18787
- Rathore, M. G., Saumet, A., Rossi, J.-F., de Bettignies, C., Tempé, D., Lecellier, C.-H., and Villalba, M. (2012) The NF- κ B member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1448–1456
- Wang J. B., Erickson, J. W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K. F., Ambrosio, A. L., Dias, S. M., Dang, C. V., and Cerione, R. A. (2010) Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 207–219
- Colombo, S. L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., De Leon, J., Schmitt, C. A., Boorn, L., Davis, N., and Moncada, S. (2010) Anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1 coordinates glycolysis and glutaminolysis with transition to S phase in human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 18868–18873
- Lukey, M. J., Greene, K. S., Erickson, J. W., Wilson, K. F., and Cerione, R. A. (2016) The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nat. Commun.* **7**, 11321
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., and Prives, C. (2010) Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7461–7466
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010) Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 7455–7460
- Szeliga, M., and Albrecht, J. (2015) Opposing roles of glutaminase isoforms in determining glioblastoma cell phenotype. *Neurochem. Int.* **88**, 6–9
- Szeliga, M., Bogacińska-Karaś M., Różycka, A., Hilgier, W., Marquez, J., and Albrecht, J. (2014) Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumour Biol.* **35**, 1855–1862
- Liu, J., Zhang, C., Lin, M., Zhu, W., Liang, Y., Hong, X., Zhao, Y., Young, K. H., Hu, W., and Feng, Z. (2014) Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **5**, 2635–2647
- Krebs, H. (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.* **29**, 1951–1969
- Curthoys, N. P., Kuhlenschmidt, T., Weiss, R. F., and Godfrey, S. S. (1976) Phosphate-dependent activity glutaminase from rat kidney and identity with glutaminase in response to acidosis from other tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 162–167
- Curthoys, N. P., and Watford, M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 133–159
- Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W. W., and Abcouwer, S. F. (1999) Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol. Genomics* **1**, 51–62
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J. A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J. A., Alonso, F. J., Matés, J. M., and Márquez, J. (2012) Mammalian glutaminase *Gls2* gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS ONE* **7**, e38380
- Cassago, A., Ferreira, A. P., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Gomes, E. R., Greene, K. S., Pereira, H. M., Garratt, R. C., Dias, S. M., and Ambrosio, A. L. (2012) Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 1092–1097
- Campos-Sandoval, J. A., López de la Oliva, A. R., Lobo, C., Segura, J. A., Matés, J. M., Alonso, F. J., and Márquez, J. (2007) Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 765–773

The multidomain architecture of human glutaminases

22. Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos, J. A., Khan, Z. U., Alonso, F. J., Segura, J. A., Márquez, J., and Aledo, J. C. (2002) Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **277**, 38939–38944
23. Ferreira, A. P., Cassago, A., Gonçalves Kde, A., Dias, M. M., Adamoski, D., Ascensão, C. F., Honorato, R. V., de Oliveira, J. F., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Bettini, J., Oliveira, P. S., Paes Leme, A. F., Portugal, R. V., Ambrosio, A. L., and Dias, S. M. (2013) Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *J. Biol. Chem.* **288**, 28009–28020
24. Brown, G., Singer, A., Proudfoot, M., Skarina, T., Kim, Y., Chang, C., Dementieva, I., Kuznetsova, E., Gonzalez, C. F., Joachimiak, A., Savchenko, A., and Yakunin, A. F. (2008) Functional and structural characterization of four glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **47**, 5724–5735
25. de Beer, T., Carter, R. E., Lobel-Rice, K. E., Sorkin, A., and Overduin, M. (1998) Structure and Asn-Pro-Phe binding pocket of the Eps15 homology domain. *Science* **281**, 1357–1360
26. Pace, N. R. (2009) Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 565–576
27. Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., et al. (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157–2167
28. Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K., Benito-Gutiérrez, E. L., Dubchak, I., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J. J., Grigoriev, I. V., et al. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**, 1064–1071
29. Smith, J. J., Kuraku, S., Holt, C., Sauka-Spengler, T., Jiang, N., Campbell, M. S., Yandell, M. D., Manousaki, T., Meyer, A., Bloom, O. E., Morgan, J. R., Buxbaum, J. D., Sachidanandam, R., Sims, C., Garruss, A. S., et al. (2013) Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nat. Genet.* **45**, 415–421
30. Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Sutoh, Y., Kasahara, M., Hoon, S., Gangu, V., Roy, S. W., Irimia, M., Korzh, V., et al. (2014) Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* **505**, 174–179
31. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498–503
32. Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I. L., Blumberg, B., Dichmann, D. S., Dubchak, I., Amaya, E., et al. (2010) The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* **328**, 633–636
33. Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 311–316
34. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., and Peng, Z.-Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **13**, 1435–1448
35. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
36. Robinson, M. M., McBryant, S. J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D. V., Hamilton, S. K., Hansen, J. C., and Curthoys, N. P. (2007) Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J.* **406**, 407–414
37. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G. J. (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **43**, W389–W394
38. Bergthorsson, U., Andersson, D. I., and Roth, J. R. (2007) Ohno's dilemma: evolution of new genes under continuous selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 17004–17009
39. Mosavi, L. K., Minor, D. L., Jr., and Peng, Z.-Y. (2002) Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16029–16034
40. Zhang, C., Liu, J., Zhao, Y., Yue, X., Zhu, Y., Wang, X., Wu, H., Blanco, F., Li, S., Haffty, B. G., Hu, W., and Feng, Z. (2016) Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *Elife* **5**, e10727
41. Scott, A. P. (1987) Reproductive endocrinology of fish. In *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology* (Chester-Jones, I., Ingleton, P. M., Philips, and J. G., eds), pp. 223–256, Springer US, New York, NY
42. DeLaBarre, B., Gross, S., Fang, C., Gao, Y., Jha, A., Jiang, F., Song, J. J., Wei, W., and Hurov, J. B. (2011) Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry* **50**, 10764–10770
43. Olalla, L., Gutiérrez, A., Jiménez, A. J., López-Téllez, J. F., Khan, Z. U., Pérez, J., Alonso, F. J., de la Rosa, V., Campos-Sandoval, J. A., Segura, J. A., Aledo, J. C., and Márquez, J. (2008) Expression of the scaffolding PDZ protein glutaminase-interacting protein in mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* **86**, 281–292
44. Russo, A. A., Tong, L., Lee, J.-O., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1998) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**, 237–243
45. Chiswell, B. P., Zhang, R., Murphy, J. W., Boggon, T. J., and Calderwood, D. A. (2008) The structural basis of integrin-linked kinase-PINCH interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 20677–20682
46. Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., Ota, M., Yamakuni, T., Maeda, Y., and Nitani, Y. (2010) Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation: steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol.* **8**, e1000416
47. Holzer, S., Ban, N., and Klinge, S. (2013) Crystal structure of the yeast ribosomal protein rpS3 in complex with its chaperone Yarl1. *J. Mol. Biol.* **425**, 4154–4160
48. Robin, G., Sato, Y., Desplancq, D., Rochel, N., Weiss, E., and Martineau, P. (2014) Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J. Mol. Biol.* **426**, 3729–3743
49. Li, Y., Meng, X., Xiang, Y., and Deng, J. (2010) Structure function studies of vaccinia virus host range protein k1 reveal a novel functional surface for ankyrin repeat proteins. *J. Virol.* **84**, 3331–3338
50. Hesketh, G. G., Pérez-Dorado, I., Jackson, L. P., Wartosch, L., Schäfer, I. B., Gray, S. R., McCoy, A. J., Zeldin, O. B., Garman, E. F., Harbour, M. E., Evans, P. R., Seaman, M. N., Luzio, J. P., and Owen, D. J. (2014) VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev. Cell.* **29**, 591–606
51. Huttlin, E. L., Ting, L., Bruckner, R. J., Gebreab, F., Gygi, M. P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., Dong, R., Guarani, V., Vaites, L. P., Ordureau, A., Rad, R., et al. (2015) The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell* **162**, 425–440
52. Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Sayers, E. W. (2016) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **44**, D67–D72
53. Lassmann, T., and Sonnhammer, E. L. (2005) Kalign: an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics* **6**, 298
54. Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313
55. Sukumaran, J., and Holder, M. T. (2010) DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics* **26**, 1569–1571
56. Schliep, K. P. (2011) phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* **27**, 592–593
57. Muhire, B. M., Varsani, A., and Martin, D. P. (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* **9**, e108277
58. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797
59. Tatusov, R. L., Koonin, E. V., and Lipman, D. J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631–637
60. Huang, X., and Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**, 337–357

61. Levy, A., Sela, N., and Ast, G. (2008) TranspoGene and microTranspoGene: transposed elements influence on the transcriptome of seven vertebrates and invertebrates. *Nucleic Acids Res.* **36**, D47–D52
62. Leslie, A. G. W., and Powell H. R. (2007) Processing diffraction data with mosflm. In *Evolving methods for macromolecular crystallography* (Read, R. J., and Sussman, J. L., eds), pp. 41–51, Springer, Dordrecht, Netherlands
63. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
64. Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214
65. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
66. Sheldrick, G. M. (2010) Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 479–485
67. Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., and Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2184–2195
68. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
69. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501
70. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282
71. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
72. Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Kikhney, A. G., and Svergun, D. I. (2007) ATSAS 2.1: towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, s223–s228
73. van Heel, M., Portugal, R., Rohou, A., Linnemayr, C., Bebeacua, C., Schmidt, R., Grant, T., and Schatz, M. (2012) Four-dimensional cryo-electron microscopy at quasi-atomic resolution: IMAGIC 4D. *Int. Tables. Acta Crystallogr.* **Vol. F**, ch. 19.9, 624–628
74. Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S. J. (2007) EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 38–46
75. Yang, Z., Fang, J., Chittuluru, J., Asturias, F. J., and Penczek, P. A. (2012) Iterative stable alignment and clustering of 2D transmission electron microscope images. *Structure* **20**, 237–247
76. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612

The origin and evolution of human glutaminases and their atypical C-terminal ankyrin repeats

Camila Cristina Pasquali, Zeyaul Islam, Douglas Adamoski, Igor Monteze Ferreira, Ricardo Diogo Righeto, Jefferson Bettini, Rodrigo Villares Portugal, Wyatt Wai-yin Yue, Ana Gonzalez, Sandra Martha Gomes Dias and Andre Luis Berteli Ambrosio

J. Biol. Chem. 2017, 292:11572-11585.

doi: 10.1074/jbc.M117.787291 originally published online May 19, 2017

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M117.787291](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787291)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2017/05/25/M117.787291.DC1>

This article cites 74 references, 28 of which can be accessed free at

<http://www.jbc.org/content/292/27/11572.full.html#ref-list-1>

9.2. Termo de Autorização do Comitê de Biossegurança.

1. Título do projeto: Caracterização biofísica e estrutural da interação entre KGA (kidney type glutaminase) e PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) e Estudos biofísicos e bioquímicos das glutaminases de humanos em complexo com novos parceiros de interação.

2. Pesquisador responsável: Andre Luis Berteli Ambrosio

3. Experimentador(es):

Camila Cristina Pascoal e Zeyaul Islam

Nível do treinamento do experimentador: ☐ -Iniciação científica, ☐ -mestrado, ☐ -doutorado, [CCP]-doutorado direto, [ZI]-pós-doutorado, ☐ -nível técnico, ☐ -outro, especifique: -

4. Unidade operativa: ☐ LNLS ☐ LNNano ☐ CTBE ☒ LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: ☒ Risco I ☐ Risco II ☐ Risco III ☐ Risco IV

6. O projeto é confidencial? ☒ não ☐ sim

7. O título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? ☐ não ☒ sim

8. Qual é o objetivo do projeto? Descrição das bases moleculares e estruturais da interação direta entre glutaminases e o fator de transcrição PPAR γ .

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM. Bactéria *E. coli* cepa BL21(DE3), plasmídeo pET28a, expressando diversas construções das proteínas KGA e PPAR γ humanas.

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM: (1) Expressão heteróloga da KGA humana completa (2) expressão heteróloga de construções alternativas de PPAR γ , como somente o domínio de ligação ao ligante ou deste em fusão como domínio de ligação ao DNA.

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não.

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? ☒ Não ☐ Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? ☒ Não ☐ Sim: _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva. Todos os OGMs apresentam resistência ao antibiótico kanamicina. Nenhum transgene confere infectividade ou patogenicidade ao organismo receptor.

O pesquisador principal tem conhecimento de que os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados na execução do projeto e que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

Assinatura eletrônica do pesquisador responsável:



A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 18/3/16.

Parecer final: ☒-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

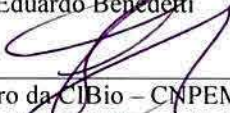
comentários da CIBio:



Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio
Marcio Chaim Bajgelman



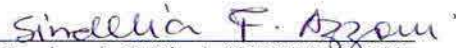
Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Celso Eduardo Benedetti



Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Carolina Bersoi Moraes H. Freitas



Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Roberto Ruller



Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Sindélia Freitas Azzoni



Membro da CIBio da CNPEM –CTBE
Marina Camara Mattos Martins Soldi

9.3. Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada “**ANÁLISES EVOLUTIVA, ESTRUTURAL E MECANÍSTICA DA ARQUITETURA MULTIDOMÍNIO DAS GLUTAMINASES HUMANAS E ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE GLUTAMINASES E O RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA**”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de julho de 2017

Assinatura :



Nome do(a) autor(a): **Camila Cristina Pasquali**

RG n.º 44.949.929-7

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Andre Luis Berteli Ambrosio**

RG n.º 23.340.996-8